GENETISCHE UND ZYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN METHANOLVERWERTENDEN SELBSTFERTILEN HEFEN

Dissertaion
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der
Ruhr-Universität Bochum

von
ANGKANA CHAIPRASERT
aus Bangkok

Bochum 1983

UNIV.
LEIDEN
NED.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547222_0004

"Plangpatanapanichya und Chaiprasert"
gewidmet

GENETISCHE UND ZYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN METHANOLVERWERTENDEN SELBSTFERTILEN HEFEN

D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der

Abteilung für Biologie

an der

Ruhr-Universität Bochum

von

Angkana Chaiprasert

aus Bangkok

Bochum 1983

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akedemischen
Austauschdienstes

Herrn Professor Dr.Dr.h.c. K.Esser, meinem Doktorvater, danke ich vielmals für seine großzügige Unterstützung und wertvollen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. U.Stahl danke ich herzlich für seine ständige Hilfsbereitschaft und die beste Betreuung.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn U.Schmidt, Herrn H.D. Osiewacz, Frl.U.Kües und Frau C.Lang-Hinrichs für die anregenden Diskussionen und auch mancher Korrektur verpflichtet.

Bedanken möchte ich mich weiter bei Herrn Priv.Doz.Dr.P. Tudzynski, Dr.U.Kück, Dr.F.Meinhardt und Herrn W.Minuth für ihre Bereitschaft zu Diskussionen.

Weiterhin danke ich allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Allgemeine Botanik, welche mir technische Unterstützung gewährt haben, besonders Herrn K.Kuncl, Herrn H.Marlow und Herrn R.Blaurock.

Mein besonderer Dank gilt auch dem deutschen akademischen Austauschdienst (DAAD), der durch ein Stipendium die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglichte.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit untergliedert sich in einen theoretischen Teil und einen praktischen Teil.

Im theoretischen Teil werden dabei verschiedene Gesichtspunkte der Biologie, der Genetik und zum Teil der Physiologie der Hefen, soweit sie für das Verständnis der im praktischen Teil beschriebenen Phänomene notwendig sind, besprochen.

Im praktischen Teil werden Untersuchungen zu den Entwicklungszyklen und dem Fortpflanzungsverhalten der verwendeten Hefestämme dargestellt. Schließlich werden Kreuzungsexperimente zur Aufklärung der Regulation des Methanolstoffwechsels und zum Nachweis von Rekombinationsvorgängen als Voraussetzungen für eine zukünftige gezielte Stammverbesserung vorgestellt und diskutiert.

GENETISCHE UND ZYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN METHANOLVERWERTENDEN SELBSTFERTILEN HEFEN

Inhaltsverzeichnis: Seite:

Theoretischer Teil 1 - 43

I. Einführung 1

A. Biologie der Hefen

1. Kriterien für die Hefe-Bestimmung 2
2. Genetische Kontrolle der sexuellen Fortpflanzung 8
   a. Benennung, Funktion und Lokalisation der Kreuzungstyp - Gene 9
   b. Kreuzungstyp - Genkonversion bzw. Gentransposition bei Saccharomyces cerevisiae 13
      1. Gene, die an der Konversion beteiligt sind 13
      2. Konversionsmodelle und Aufklärung des Konversions-Mechanismus 14
      3. Weitere Kerngene, die den Kreuzungstyp-Komplex oder das HO - Gen regulieren 18
   c. Kreuzungstyp - Konversion bei Schizosaccharomyces pombe 20

B. Austausch genetischer Information via Protoplasten 22

1. Protoplastenfusion 22
   a. Grundlagen 22
   b. Anwendung 23
2. Protoplasteninfektion 28
   a. Protoplasteninfektion von Hefen mit nackter DNA (Transformation) 28
   b. Weitere Möglichkeiten der Protoplasteninfektion (Transformation) von Hefe 31

C. Methylotrophe Hefen und deren Methanol - Stoffwechsel 34

1. Methanol - verwertende Hefen 35

2. Biochemische Regulation des Methanol - Stoffwechsels bei Hefen 36
a. Methanol - Dissimilation 36
b. Methanol - Assimilation 40

D. Ploblemstellung 42

Praktischer Teil 44-121
II Material und Methoden
A. Stämme 44
B. Medien und Kulturbedingungen 44
C. Physiologische und morphologische Charakterisierung von Hefe 46
a. Fermentation und Assimilation von Kohlenstoff sowie Stickstoff
b. Bestimmung der linearen Wachstumsrate
c. Bestimmung des Zellvolumens
d. Bestimmung des Ploidiegrades
D. Zytologische Methoden 46
a. Färbung der vegetativen Kerne mit Auramin - O
b. Giemsa - Kernfärbung
c. Feulgen - Karminessigsäure Kernfärbung
E. Biochemische Methode zur Bestimmung des DNA - Gehaltes 48
a. Extraktion der DNA
b. Bestimmung des DNA - Gehaltes
F. Genetische Methoden 49
a. Sporisolation
b. Isolierung von Varianten
c. Auxotrophie - Test 50
d. Kreuzung zweier Varianten 50
(1) durch Mischen von Zellen
(2) durch Protoplastenfusion
e. DNA - Isolation 52
f. DNA - Charakterisierung 52

III Ergebnisse 54
A. Charakterisierung der verwendeten Hefestämmen
1. Physiologie 54

2. Ermittlung der optimalen Wachstums und Sporulationsbedingungen 55
3. Bestimmung der Kernzahl 56
B. Aufklärung der Cntogenese 57
1. Nachweis des Kernphasenwechsels 57
a. Zytologischer Nachweis von Meiose und Mitose 57
aa. Meiose
ab. Mitose 63
b. Quantifizierung des DNA-Gehaltes 65
c. Bestimmung des Zullvolumens 66
d. Unterscheidung des Ploidiegvades von Einzell - bzw. Einsporkulturen mit Hilfe eines spezifischen Farbtestes 69
2. Nachweis von Kreuzungstypen 73
3. Die Entwicklungszyklen von P.lindnerii und P. pinus 76
C. DNA - Analyse 78
1. Dichtebestimmung und GC-Gehalt 79
2. Restriktionsanalyse der mtDNA 81
D. Genetische Untersuchungen 86
1. Austausch genetischer Information 86
a. Charakterisierung der verwendeten auxotrophen Varianten bzw.Mutanten 86
b. Rekombination zwischen Stämmen der gleichen Art 87
c. Rekombination zwischen Stämmen verschiedener Arten 95
2. Genetik der Sektorbildung 102
3. Genetik der Methanolverwertung 105

IV Diskussion 111

V. Zusammenfassung 121

VI. Literaturverzeichnis

Theoretischer Teil

I. Einführung

Hefen sind Mikroorganismen, die zur großen Gruppe der Pilze gehören und meistens als Einzeller vorkommen. Sie vermehren sich vegetativ durch Sprossung oder Spaltung. Abhängig von ihrer taxonomischen Zugehörigkeit bilden sie im Verlauf der sexuellen Vermehrung Asci bzw. Basidien mit im allgemeinen 2 bis 4 Sporen. Asci bzw. Basidien entwickeln sich entweder aus Zygoten oder vegetativen Zellen (Rose und Harrison 1969; Lodder 1970).

Der Holländer Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) war der Erste, der Hefezellen unter dem Mikroskop beobachtet hat. In der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurden mit der beginnenden wirtschaftlichen Nutzung von Hefen erste Untersuchungen zur Hefebiologie durchgeführt. Im Jahr 1837 stellte Cagniard-Latour erstmals fest, daß Hefen offenbar entscheidend am Brauprozeß beteiligt sind. Auf Grund ihrer Tätigkeit, Zucker zu verwerten, prägte Schwann für die Hefen den Namen "Zuckerpilze". Der wissenschaftliche Name Saccharomyces (=Zuckerpilz) wurde von Kutzing in die Taxonomie eingeführt und gibt heute einer Hefegattung ihren Namen.

Auf dem Gebiet der Hefe-Taxonomie sind die Arbeiten von Emil Christian Hansen, Alfred Jörgensen und Alexandre Guilliermond von grundlegender Bedeutung. Guilliermonds Buch "Les Levures" war das erste, das einen Bestimmungsschlüssel für Hefen enthielt. Heute werden die Hefen in 39 Gattungen mit 350-400 Arten eingeteilt (Lodder 1970). Diese Gattungen werden von Lodder in drei verschiedene Gruppen zusammengefaßt:

1. Ascomyceten mit 22 Gattungen,
2. Asporoascomyceten mit 12 Gattungen,
3. Hefe-ähnliche Pilze mit 5 Gattungen.

Neben diesem Klassifizierungssystem, das die Hefen in der Ordnung Endomycetales zusammenfaßt, be-

stehen noch andere, in der Literatur nicht so häufig verwendete Systeme. So teilt z.B. Windisch (1960) die Hefen in 2 Ordnungen ein (Endomycetales und Fungi imperfecti), während sie Kudrjawzew (1960) ebenfalls einer zuordnet (Saccharomycetales). In jedem dieser Systeme erfolgt die weitere Einordnung nach unterschiedlichen Gesichtspunkten (siehe Tab. 1).

Autor	Ordnung	Familie	Unter-Familie
Kudrjawzew (1960)	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	
		Schizosaccharomycetaceae	
		Saccharomycodaceae	
Windisch (1960)	Endomycetales	Endomycetaceae	
		Saccharomycetaceae	
	Fungi imperfekti	Cryptococcaceae	
		Sporobolomycetaceae	
Lodder (1970)	Endomycetales	Endomycetaceae	
		Saccharomycetaceae	
			Schizosaccharomycoidae
			Nadsoniodeae
			Saccharomycoideae
			Lipomycetoideae
		Spermophthoraceae	

Tab. 1: Systeme der Hefe-Klassifizierung.

A. Biologie der Hefen

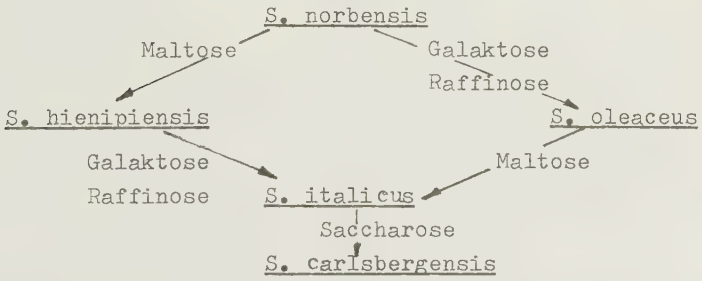
1. Kriterien für die Hefe-Bestimmung

Zur Klassifizierung von Hefen kommen sowohl morphologische als auch physiologische Merkmale zur Anwendung. Morphologische Eigenschaften wie z.B. die Zellform, die Art der vegetativen Fortpflanzung, die Fähigkeit Pseudomyzel zu bilden, die Gestalt, Zahl und Größe der Ascosporen und Asci (Basidiosporen und Basidien) sind die am häufigsten benutzten Gattungs-Kriterien. Als Art-Kriterien dienen meistens physiologische Merkmale, wie

Assimilation und Fermentation von Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen, die Empfindlichkeit gegen Antibiotika, das Wachstum in Abhängigkeit von der Temperatur etc. (ausführliche Informationen in Lodder 1970).

Genau wie die Taxonomie höherer Organismen ist die Hefe-Klassifizierung ein künstliches Einteilungssystem. Erfahrungsgemäß ist aber die Benutzung künstlicher Kriterien in der Taxonomie in vielen Fällen problematisch, da sie keinen Bezug zu Verwandschaftsverhältnissen zulassen. Besonders physiologische Merkmale können innerhalb einer Organismengruppe unterschiedliche genetische Stabilität besitzen und die Art-Abgrenzung erschweren.Darüber hinaus ist oft nur schwer abzuschätzen, ob der Unterschied in einem einzigen morphologischen bzw. physiologischen Merkmal zur Differenzierung in verschiedene Gattungen bzw. Arten ausreicht (Gorin und Spencer 1970) oder ob es sich dabei nur um Mutanten z.B. einer Art handelt.

Scheda und Yarrow (1966) fanden z.B. eine große Variabilität der Fermentation und Assimilation von Kohlenstoff-Quellen in der Gattung Saccharomyces und definierten allein auf Grund dieser Eigenschaft unterschiedliche Arten (siehe Schema). Demnach ließe sich durch eine die Kohlenstoff-Fermentation betreffende Mutation eine Art in eine andere überführen.



Die Entstehung von Saccharomyces-Arten durch den Erwerb, Galaktose, Maltose, Raffinose bzw. Saccharose zu fermentieren.

Ein weiteres Beispiel für den Art-Wechsel durch eine Ein-Gen-Mutation findet sich in der Gattung Candida. Durch Verlust der Cellobiose-Assimilation wird Candida berthetii

in Candida boidinii überführt. Stahl und Esser (1979 a, 1979 b) schlugen in diesem Fall vor, zusätzlich zu den physiologischen Daten auch die Genetik (Ploidie-Grad, Fortpflanzungsmodus, Kreuzungstyp etc.) zur Art-Abgrenzung zu benutzen.

Auch andere Merkmale und Eigenschaften von Hefen versuchte man in die Taxonomie einzuführen, besonders das Vorkommen und die Zusammensetzung von Makromolekülen wie Polysaccharide, Proteine und Nukleinsäuren (Gorin und Spencer 1970). Diese als Chemo-Taxonomie bezeichnete Artencharakterisierung läßt das Vorhandensein bzw. Fehlen einer Korrelation zwischen verschiedenen Species gut erkennen (van Rij 1969). Das Kriterium "Proteine und Enzyme" hat in der Chemo-Taxonomie jedoch nur eine untergeordnete Bedeutung erlangt, da diese Merkmale, abhängig von den jeweiligen physiologischen Bedingungen (Temperatur, Substrat usw.) eine sehr starke Variabilität aufweisen können. Bemerkenswert ist eine Arbeit von Margolisch und Schejter (1966), die Auskunft über Aminosäurezusammensetzung und Variabilität des Cytochrom c verschiedener Hefen und anderer Pilze gibt.

> Bemerkenswert ist jedoch in diesem Zusammenhang, daß z.B. Cytochrom c ein äußerst stabiles und daher taxonomisch relevantes Merkmal darstellt.(Margoliash und Schejter 1966). Seine Aminosäurenzusammensetzung ist bei unterschiedlichen Hefen verschieden, innerhalb einer Taxa jedoch konstant.

Ein weitaus wichtiges Kriterium ist die Beschaffenheit der Hefe-Zellwand, deren Hauptbestandteile Glukan, Mannan, Chitin sowie Proteine und Lipide sind. Hefen verschiedener Arten weisen sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellwand auf (van Rij 1969). Resonanzspektroskopie-Untersuchungen der Polysaccharid-Struktur von Haupt- und Seitenketten oder das Muster von Mannose-enthaltenden-Polysacchariden ließen den Schluß zu: je ähnlicher die chemische Struktur, desto enger die Verwandschaft der Hefen(ausführliche Information siehe Gorin und Spencer 1970).

Die ähnliche Basenkomposition von Nukleinsäuren eng verwandter Organismen läßt sich ebenfalls für

die Artbestimmung ausnutzen. Diese wurde ursprünglich bei Bakterien festgestellt (Marmur et al. 1963) und kommt auch dort zur taxonomischen Einordnung zum Tragen. Bei niederen Eukaryonten untersuchte Storck (1966) den Guanin-Cytosin (GC)-Gehalt von Nukleinsäuren und erkannte, daß das GC-Verhältnis neben einer phylogenetischen auch eine taxonomische Signifikanz besitzt. Seit dieser Zeit wurden verschiedene Hefen aus folgenden Gattungen untersucht und ihr GC-Gehalt bestimmt:

GC-Gehalt von verschiedenen Hefe-Gattungen

Hefearten		GC %	Referenz
Candida			
C. albicans	CBS 2712	35,1	Stenderup und Leth Bak
C. catenulata	CBS 565	54,5	1968, 1969
C. pseudotropicalis	CBS 607	41,3	
C. zeylanoides	CBS 619	57,6	
C. tropicalis	CBS 120/5	34,9	
C. maltosa	ATCC20275	36,6	Meyer et al. 1975
C. sake	ATCC28721	38,8	
Cryptococcus			
C. laurentii	CBS 569	49,0	Storck, Alexopoulos
C. melibiosum	FS 52-87	61,0	und Phaff 1969
C. neoformans	CBS 4572	51,5	
Rhodotorula			
R. graminis	CBS 2826	70,0	
R. minuta	CBS 319	53,0	
R. pallida	CBS 2623	63,5	
Sporobolomyces			
S. albo-rubescens	CBS 482	63,0	
S. odorus	CBS 483	65,0	
S. roseus	CBS 492	53,5	
Sporidiobolus			Holzschu, Tredick
S. ruinenii	UCD67-67	64,7	und Phaff 1981
S. salmonicolor	UCD68-37	62,0	
Kluyveromyces			Martini, Phaff und
K. drosophilarum	CBS 2105	40,5	Douglass 1972
K. lactis	CBS 4574	40,0	
K. fragilis	CBS 397	41,3	
K. veronae	CBS 2803	47,4	
Hansenula			Nakase und Komagata
H. henricii	NRRL2194	49,8	1969, 1971
H. polymorpha	NRRL5445	47,8	
H. holstii	NRRL2448	37,1	
Debaryomyces			Nakase und Komagata
D. globosus	CBS 764	45,4	1971
D. maroma	CBS 1958	36,6	
D. vanriji	CBS 3024	32,7	

Hefearten		GC %	Referenz
Pichia			Nakase und Komagata
P. wickerhamii	CBS 4107	43,2	1970
P. pastoris	CBS 704	41,0	
P. haplophila	CBS 2028	39,0	
P. polymorpha	CBS 186	35,9	Price, Fuson und Phaff
P. terricola	CBS 2617	37,4	1978
P. fluxuum	CBS 2287	33,8	
Saccharomyces			
S. cerevisiae	UCD 74-83	39,9	Price et al. 1978
S. bisporus	CBS 702	44,1	Nakase und Komagata 1971
S. rosei	CBS 2947	42,7	
S. montanus	-	41,5	Yarrow und Nakase 1975
S. bailii	-	40,5	
Schwanniomyces			
S. alluvius	-	35,2	Price et al. 1978

Tab. 2: GC-Gehalt von verschiedenen Hefe-Gattungen
CBS= Centraal Bureau voor Schimmelcultures
UCD= University of California, Davis
ATCC= American Type Culture Collection
NRRL= Northern Regional Research Laboratory

Alle Analysen zeigen, daß die Klassifizierung von Hefen über eine DNA-Charakterisierung gut mit den Ergebnissen klassischer Methoden übereinstimmt. Storck et al. (1969) bezeichneten den GC-Gehalt von Nukleinsäuren als geeignetes taxonomisches und phylogenetisches Kriterium zur Charakterisierung von Hefen und hefeähnlichen Organismen. Sie fanden, daß der GC-Gehalt für Homobasidiomyceten durchschnittlich höher war als für Pilze der anderen Klassen.

Auch Phaff (1974) empfahl, neben dem prozentualen GC-Gehalt Nukleinsäure-Hybridisierung als geeignetes Kriterium in der Hefe-Taxonomie zu verwenden. Die Charakterisierung des gesamten Genoms auf molekularer Ebene ergab eine weitaus genauere Abschätzung biologischer Ähnlichkeiten und Unterschiede von Hefe-Stämmen als einzelne phänotypische Merkmale mit meist unbekanntem genetischen Hintergrund.

Verschiedene Stämme einer Organismen-Art zeigen nur geringe Abweichungen im GC-Gehalt von weniger als 2 % (Nakase und Komagata 1971). Dieses trifft z.B. auch noch dann zu, wenn aufgrund einer Ein-Gen-Mutation

innerhalb einer Art eine Differenzierung in zwei Arten möglich ist (Stahl und Esser, 1979 b). Die Ergebnisse von Holzschu et al. (1981) lassen deutlich erkennen, daß es sich bei Abweichungen des GC-Gehalts in der Kern-DNA über 1-2 % um nicht nah verwandte Hefe-Arten handelt.

> Abweichungen des GC-Gehalts von bis zu 5 % treten innerhalb einer Art nur dann auf, wenn trotz einer physiologischen oder morphologischen Variabilität der Stämme die Bestimmung nach diesen Gesichtspunkten zur gleichen Artangehörigkeit führt oder wenn zur Ermittlung des GC-Gehalts einer Art methodisch nicht einheitlich vorgegangen wird.

Ouchi et al. (1970) untersuchten neben dem GC-Gehalt auch die Homologie der Gesamt-DNA als Bestimmungskriterium für Mikroorganismen. Sie fanden eine Korrelation zwischen Homologie und Kreuzbarkeit verschiedener Saccharomyces-Stämme. Hefen anderer Gattungen wiesen dagegen zu Saccharomyces weniger Homologie auf. Demnach wäre es möglich, mit Hilfe des DNA-Homologiegrades z.B. auch die Kreuzbarkeit von imperfekten Hefen abzuschätzen. Der annähernd gleiche GC-Gehalt der Kern-DNA von Candida utilis (45,8 %) und Hansenula jadinii (45,1 %), zwei morphologisch nahverwandte Arten, sowie deren 85-86%ige DNA-Homologie führten dazu, C.utilis als imperfekte Form von H. jadinii zu betrachten (Kurtzman et al. 1979).

> Eine Ausnahme in diesem Zusammenhang sind die von Johannsen und van der Walt (1978, 1979) bei Untersuchungen der Kreuzbarkeit verschiedener Kluyveromyces-Arten erhaltenen Ergebnisse. Jede der neun ausgewählten Arten ließ sich mit K.marxianus kreuzen und wurde auf Grund dieser Interfertilität als Biotyp bzw. physiologische Rassen von K.marxianus bezeichnet. Dagegen zeigte ein Vergleich der Gesamt-DNA dieser Organismen ein Homologiespektrum von 90 % bis weniger als 30 %.

Für Homologie- und damit Verwandtschaftsuntersuchungen läßt sich jedoch nicht nur die Gesamt-DNA heranziehen, sondern auch einzelne definierte Genbereiche. So konnten z.B. Bicknell und Douglas (1970) zeigen, daß die Sequenz des r-RNA-Genes in der Gattung Saccharomyces hoch konservativ ist, wodurch Sequenzunterschiede einen

Rückschluß auf den Verwandtschaftsgrad einzelner Arten zulassen. Ähnliches konnten Price et al. (1978) für die Gattungen Schwanniomyces, Debaryomyces und Pichia zeigen.

2 . Genetische Kontrolle der sexuellen Fortpflanzung

Die sexuelle Fortpflanzung ist durch die Aufeinanderfolge von Karyogamie und Meiose charakterisiert. Bei Hefen entstehen in der Regel als Folge dieser Sexualreaktion 4 Meiosporen durch freie Zellbildung in dem als Ascus bezeichneten Sporangium.

Sowohl physiologische Faktoren wie z.B. Nährstoffe, Stickstoffangebot, Vitamine, Temperatur, Sauerstoffbedarf als auch genetische Faktoren wie Kreuzungstypgene und Strukturgene (näheres siehe unten) haben einen Einfluß auf die Sporulation.

Für die Gattung Saccharomyces z.B. sind nach Fowell (1969) Feuchtigkeit, Luftsauerstoff, Temperaturen zwischen 25° und 30°C, Acetat, Pepton, Hefeextrakt und Vitamine wie Pantothenat in optimalen Konzentrationen für die Sporulation notwendig. In Bezug auf ihre Sporulationsfähigkeit lassen sich Hefen im klassischen Sinn in zwei Gruppen einteilen: 1. Homothallische Hefen: Die sich aus einer haploiden Ascospore entwickelnde Kolonie ist in der Lage zu sporulieren. Sporulation und Ascusbildung sind die Folge einer vorhergegangenen Autodiploidisierung. (Fusion zwischen Mutter- und Tochter-Zellen bzw. Endomitose). 2. Heterothallische Hefen: Die Voraussetzung für die Ascosporenbildung heterothallischer Hefen ist die Zellfusion zwischen haploiden Zellen unterschiedlichen Kreuzungstyps.
Neben dieser Klassifizierung ist noch ein anderes System gebräuchlich, das auf der Fähigkeit eines Organismus beruht, einen oder beide Kerne zur Karyogamie beizusteuern. Im ersten Fall spricht man von einem diözischen, im zweiten von einem monözischen Organismus (Esser und Kuenen 1967). Unterscheiden sich diözische Organismen nur auf Grund ihrer Sexualreaktion, spricht man von physiologischen Diözisten, sind morphologische Sexualmerkmale vorhanden, handelt es sich um morphologische Diözisten. Homothallische Hefen sind demnach monözische Organismen, während heterothallische Hefen physiologisch diözisch sind.

Die sexuellen Vorgänge bei Hefen müssen demzufolge einer genetischen Kontrolle unterliegen (siehe weiteren Text). Die Kontrollmechanismen sind bei folgenden Arten, vor allem bei den ersten beiden, intensiv untersucht worden.

1. Saccharomyces cerevisiae (Hansen) 1883
2. Schizosaccharomyces pombe (Lindner) Osterwalder 1924
3. Hansenula wingei (Wickerham) 1956
4. Saccharomycopsis lipolytica (Yarrow) 1972

a. Bedeutung, Funktion und Lokalisation der Kreuzungstyp-Gene

1. Saccharomyces cerevisiae (Hansen) 1883

Im Jahr 1935 konnte Winge, der erste genetische Untersuchungen an Saccharomyces durchgeführt hat, den Entwicklungszyklus der Hefen aufklären. Seit dieser Zeit wurde in zahlreichen Untersuchungen neben der Genetik verschiedenster Eigenschaften und Synthesevorgänge auch die Kreuzungsgenetik entschlüsselt (näheres siehe Esser und Kuenen 1967, Sherman und Lawrence 1974, Fincham und Day 1979). Lindegren und Lindegren (1943, 1944) waren die Ersten, die über Kreuzungstyp-Gene bei dieser Hefe berichteten. Sie fanden zwei unterschiedliche Kreuzungstypen, die später von ihnen mit a und α gekennzeichnet wurden. Heute ist bekannt, daß es sich um Allele eines Kern-Gens handelt, die auch als MATa und MATα (MAT=mating-type) bezeichnet werden. Der MAT-Locus liegt auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms, 25 cM von Centromer entfernt (Mortimer und Hawthorne 1969).

Die heterozygote a/α diploide Zelle entsteht durch Zellfusion unterschiedlicher Kreuzungstypen. Je nach Umweltbedingungen ist der diploide Zustand stabil oder es kommt zur Sporulation mit einer 2:2 Aufspaltung der Kreuzungstyp-Allele in den Tetraden. Die beiden Allele sind codominant und kontrollieren die Expression einer Reihe verschiedener Funktionen (Mackay und Manney 1974).

Die genetische Konstitution MATa/MATα in der diploiden Zelle hemmt die weitere Zellfusion

und kontrolliert die Meiose und die Sporulation. Zudem verändert sich der vegetative Sprossungs-Modus der diploiden Zellen und die Überlebensfähigkeit nach Röntgenbestrahlung wird erhöht.(näheres siehe Crandall, Egel und Mackay 1977).

Im Gegensatz dazu können die seltener auftretenden homozygoten a/a bzw. α/α diploiden Zellen zwar ihren zugehörigen Kreuzungstyp exprimieren, sind aber nicht in der Lage zu sporulieren (Roman und Sands 1953). Darüber hinaus wird die Fusion haploider Zellen der beiden Kreuzungstypen durch die Ausscheidung zelltypspezifischer a- bzw. α- Sexualhormone oder auch Pheromone gefördert (Duntze et al. 1970, Bücking-Throm et al. 1973, Wilkinson und Pringle 1974).

Das α Pheromon ist Oligopeptid aus 13 Aminosäuren in der Folge H_2N- (Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr)- COOH (Tanaka et al. 1977, Tanaka und Kita 1977). Das a-Pheromon ist ebenfalls ein Oligopeptid, dessen Sequenz noch nicht vollständig ermittelt ist (Cooper 1981).

α - und a-Pheromon zeigen eine komplementäre Wirkung und hemmen die Initiation der DNA-Synthese von Zellen des entgegengesetzten Kreuzungstyps. Hierdurch wird die erforderliche Synchronisation haploider a- und α-Zellen vor der Fusion und Zygotenbildung erreicht. (Bücking-Throm et al. 1973, Wilkinson und Pringle 1974).

2. Schizosaccharomyces pombe (Lindner) Osterwalder 1924
Sch. pombe hat einen haploiden Entwicklungszyklus. Die ersten genetischen Untersuchungen an diesem Organismus wurde von Leupold in den fünfziger Jahren durchgeführt. Die von ihm isolierten heterothallischen Stämme mit verschiedenen Kreuzungstypen bezeichnete er als h^+ oder h^-, während homothallische Stämme nach dem prozentuellen Anteil sporulierender Zellen benannt wurden (z.B. h^{90} und h^{40}: Stämme mit 90 % bzw. 40 % sporulierender Zellen in einer Kultur.

Sporulierende Kolonien konnten durch Bedampfen der Kulturplatte mit Jod sichtbar gemacht werden. Auf Grund einer stärkeähnlichen Substanz in den Ascosporen färben sich entsprechend der bekannten Jod-Stärke Reaktion sporulie-

rende Kolonien dunkelblau bis schwarz, nicht sporulierende Kolonien bleiben gelb bis schwach braun. (Ausführliche Informationen siehe Gutz et al. 1974, Egel et al. 1980, Calleja et al. 1981).

Die Kreuzungstypgene wurde von Kohli et al. (1977) auf der rechten Seite des Centromers des zweiten Chromosoms kartiert. Sie bestehen aus mindestens zwei Segmenten, mat 1^M und mat 2^P, die ca. 1 cM voneinander getrennt sind (M=Minus, P=Plus) (Leupold, 1958; Gutz und Doe 1973). Die verschiedenen Zelltypen (z.B. h^+, h^-, h^{90}) werden durch die unterschiedliche Konstitution dieses Kreuzungstyp-Komplexes bestimmt (näheres siehe weiteres Kap.). Die Funktionen der Kreuzungstyp-Gene stimmen mit denen bei S.cerevisiae überein. Sie kontrollieren vor allem die Konjugation haploider und homozygot diploider (h^+/h^+ bzw. h^-/h^-) sowie die Meiose heterozygot diploider Zellen (h^+/h^-) (Gutz 1967; Leupold 1970).

3. Hansenula wingei (Wickerham) 1956

H.wingei ist eine haploide, heterothallische Hefe. Sie wurde von Wickerham in die Genetik der niederen Eukaryonten eingeführt und besitzt die beiden unterschiedlichen Kreuzungstypen 5 und 21, die nach den Nummern der entsprechenden Isolate benannt wurden. In der heutigen Literatur sind die Buchstabenbezeichnungen A für 21 und B für 5 gebräuchlich. Die Isolate 5 und 21 agglutinieren miteinander und bilden nach Konjugation und Karyogamie Zygoten, die unter speziellen Bedingungen sporulieren. 5/21 diploide Zellen haben die Agglutinationsfähigkeit verloren. In der Tetradenanalyse ergibt sich wiederum ein 2:2 Aufspaltung (weitere Informationen: Crandall und Brock 1968 a, Crandall und Caulton 1975).
Die Fähigkeit des Erkennens von Zellen unterschiedlichen Kreuzungstyps ist durch die Anwesenheit von komplementären Glykoproteinen auf der Zellwand bedingt (näheres siehe Crandall et al. 1974).

Die Glykoproteine von Stamm 5 bzw. 21 werden als Faktor 5 bzw. 21 bezeichnet. Sie bestehen aus Mannanproteinen mit einem Kohlenhydratanteil von 50-96 % für Faktor 5 und 25-35 % für Faktor 21. Faktor 5 hat eine heterogene Struk-

tur, die in unterschiedlichen Molekulargewichten zwischen 15,000 und 100,000 Dalton und verschiedenen Sedimentations-Koeffizienten von 3,5 bis 31 S zum Ausdruck kommt. Er besitzt sechs oder mehr Bindungsstellen pro Molekül und bildet in vitro mit dem Faktor 21 lösliche Komplexe. Im Gegensatz dazu ist Faktor 21 ein homogenes Molekül mit einem MG von 40,000 Dalton und einem Sedimentations-Koeffizienten von 2,95. Dieses Molekül hemmt in vitro die Agglutinationsaktivität des Faktors 5 durch die Bildung des neutralen 5-21 Komplexes. Der Faktor 21 besitzt nur eine Bindungsstelle und kann durch Hitze, Alkali-Behandlung und Denaturierung der Protein-Kompenente inaktiviert werden (Crandall und Caulton 1975).

Im Gegensatz zu S.cerevisiae konnten bei H.wingei keine diffundierenden Sexualhormone nachgewiesen werden (Crandall und Caulton 1975). Crandall und Iovannisci (1981) haben eine Chromosom-Karte der Hefe H.wingei mit Hilfe der Tetradenanalyse von 13 Marken auf vier verschiedenen Chromosomen und zwei Fragmenten aufgestellt. Das Kreuzungstypgen (abgekürzt in dieser Arbeit als mat 1) liegt auf dem rechten Arm des ersten Chromosoms, 26 cM von Centromer entfernt.

4. Saccharomycopsis lipolytica (Yarrow) 1972

Erst im Jahre 1970 konnte für die Alkanhefe S.lipolytica von Wickerham ein sexueller Zyklus nachgewiesen werden, nachdem bis dahin nur die als Candida lipolytica bezeichnete imperfekte Form bekannt war. Der Nachweis von Kreuzungstypen gelang Gaillardin und seinen Mitarbeitern im Jahre 1973. Die Kreuzungstypen wurden als + und- (Esser und Stahl 1975) bzw. mit A und B (Wickerham et al. 1970, Bassel und Mortimer 1973) gekennzeichnet. In der Natur kommt diese Hefe als haploider Organismus mit vorwiegend nur jeweils einem Kreuzungstyp vor.

Bei S.lipolytica sind die Kreuzungstypgene noch nicht lokalisiert. Die Genkartierung dieser Hefen wurde erst vor kurzem begonnen und ist noch nicht abgeschlossen (Ogrydziak et al. 1982). In Bezug auf die Funktion der Kreuzungstypgene ist für S.lipolytica bekannt, daß die Gene zwar für die Zellfusion, offenbar aber nicht für die Meiose von Bedeutung sind. Fusioniert man Protoplasten haploider Zellen gleichen Kreuzungstyps, so erhält man sporulationsfähige diploide Zellen(Stahl 1978).

b. Kreuzungstyp-Genkonversion bzw. Gentransposition bei Saccharomyces cerevisiae

1. Gene, die an der Konversion beteiligt sind.
(Konversions-spezifische Gene)

Bei der Sporulation von a/α diploiden Zellen entstehen vier Ascosporen, die als getrennte Einsporkulturen entweder mit dem Kreuzungstyp a oder α auswachsen. Weder a noch α sind in der Lage zu sporulieren. Diese sogenannten heterothallischen Stämme können den Kreuzungstyp mit einer Häufigkeit um 10^{-6} wechseln.

Bei homothallischen Stämmen lassen sich in ursprünglich haploiden Einsporkulturen auch diploide Zellen finden, die zur Sporulation befähigt sind (Mortimer und Hawthorne 1969). Diese sporulierenden Klone entstehen aus fusionierten Zellen der Einsporkultur (Takano und Oshima 1967). Für diesen "Selbstungsvorgang" ist ein dominantes nukleäres Gen HO (= homothallism) verantwortlich.

Da es gelang, das HO-Gen von S.chevalieri in S.cerevisiae einzukreuzen, konnte festgestellt werden, daß es für die Konversion des Kreuzungstyps (MAT) von a nach α bzw. α nach a verantwortlich ist, da die Frequenz von 10^{-6} auf 0,5 pro Generation steigt (Takano und Oshima 1970, 1971, Hicks und Herskowitz 1976). Interessanterweise ist das HO-Gen nicht mit den Kreuzungstypen gekoppelt (Takano und Oshima 1967) und befindet sich auf der 4. Kopplungsgruppe (Rine und Herskowitz 1980).

Naumov und Tolstorukov (1973), Harashima et al. (1974) fanden jedoch, daß für eine Kreuzungstypkonversion zusätzlich zu dem HO-Gen noch zwei weitere"Allele" erforderlich sind. Sie wurden mit HMLα und HMRa bezeichnet und sind je 50-60 cM links bzw. rechts des Kreuzungstyplocus (3. Kopplungsgruppe) lokalisiert (Harashima und Oshima 1976).

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß auch bei anderen Hefen (Sch.pombe, Leupold 1980 oder Kluyveromyces lactis, Herman und Roman 1966) in der Nachbarschaft der Kreuzungstyploci Gene festgestellt werden konnten, die für den Kreuzungstypwechsel verantwortlich sind.

2. Konversionsmodelle und Aufklärung des Konversions-Mechanismus

Wie dargestellt, sind an der Konversion des Kreuzungstyp bei S.cerevisiae neben dem Kreuzungstyp-locus (MAT) die beiden "Allele" HMR bzw. HML und das Gen HO beteiligt. Was ihre molekulare Funktion betrifft, wurde auf Grund von formalgenetischen Untersuchungen und in Anlehnung an die beim Mais vermuteten transponierbaren genetischen Elemente das sogenannte "Kassetten-Modell" postuliert (Oshima und Takano 1971, Hicks et al. 1977). Unter Regulation des HO-Gens sind die genetischen Informationen HML α bzw. HMRa kopiert und auf den MAT-Locus transponiert, wodurch dieser dann den Kreuzungstyp α oder a aufweist.

Dieses Postulat konnte von Takano und Mitarbeitern (1973) durch Untersuchungen an natürlichen MAT-α Stämmen bestätigt werden. In diesen als MAT-α^{inc} (inc= inconvertible) bezeichneten Stämmen wird das Kreuzungstyp-Umspringen von MAT α zu MATa durch das HO-Gen in seiner Häufigkeit von 0,5 auf 10^{-3} reduziert. Springen diese abgeleiteten MATa-Stämme wieder zu MAT α zurück, erhält man nicht MAT-α^{inc}, sondern normale MAT α Stämme. Hier hatte man den ersten experimentellen Nachweis, daß Hefen eine nicht exprimierte Wildtyp-Information für den Kreuzungstyp irgendwo auf dem Genom besitzen müssen.

Das auf Grund von formalgenetischen Befunden postulierte Kassetten-Modell konnte auch durch molekulare Daten weitgehend bestätigt werden. Zum einen durch eine spezifische Mutation im HML α "Allel", die nur bei der Transponierung in dem MAT-Locus (also beim "Umspringen" von a nach α) exprimiert wird, da sie "mit springt". Da ähnliches auch für HMRa festgestellt werden konnte, liegt die Folgerung nahe, daß HML α bzw. HMRa α bzw. a spezifische DNA-Sequenzen tragen müssen (Kuschner et al. 1979). Zum anderen gelang durch Heteroduplexanalyse der Nachweis sowohl von homologen als auch nicht homologen Sequenzen einerseits zwischen HML und HMR, andererseits zwischen HML und MAT und HMR und MAT, was auf ihre enge Verwandtschaft, aber auch auf funktionelle Unterschiede (HML-HMR) hinweist (Nasmyth und Tatchell 1980); (siehe auch Abb.1).

Grundlage letzterer Untersuchungen war der von Hicks et al. (1979) klonierte MAT-Bereich. In diesem Zusammenhang ist zu vermerken, daß kürzlich auch formalgenetisch nachgewiesen wurde, daß HMR und HML bzw. MAT zumindest teilweise homolog sind (Sprague et al. 1981).

HML und HMR besitzen an den Enden mit Z_1 (230 bp) und X(700 bp) bezeichnete homologe Abschnitte (s. Abb. 1), die sich auch im MAT-Locus wiederfinden. Sie unterscheiden sich durch die dazwischen liegenden a- bzw. α-spezifischen Sequenzen Y_a (700 bp) und $Y\alpha$ (850 bp). Der genaue Aufbau ist Abb. 1 zu entnehmen.

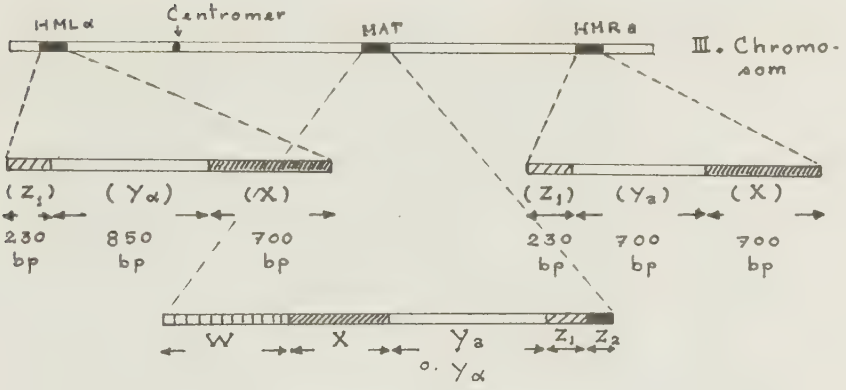


Abb. 1: Schematische Darstellung des Kreuzungstyp-Locus (MAT) und den beiden "stillen" Kopien HMLα und HMRa. Die homologen Bereiche sind auf dem Insert durch Schraffur gekennzeichnet.

Aufgrund der festgestellten Sequenz-Homologien zwischen HML bzw. HMR und MAT wird deutlich, daß der Kreuzungstypwechsel einer Genkonversion entspricht. Der dabei ablaufende nicht reziproke Rekombinationsvorgang wird mechanistisch offenbar durch eine spezifische Faltung des entsprechenden Chromosomabschnittes erreicht, so daß der aktive und der "stille" hintereinander zu liegen kommen.

Die Vermutung, daß Genkonversion und Kreuzungstypwechsel eine gemeinsame Grundlage haben, wird auch durch Untersuchungen an sogenannten rad 52-Mutanten bekräftigt, bei denen eine niedrige Rekombinationsfrequenz (meiotisch

und mitotisch) immer mit einem Fehlen eines Kreuzungstypwechsels einhergeht (Malone und Esposito 1980).

Es ist allerdings bisher unbekannt, ob bzw. in welcher Form ein Genprodukt an der Konversionsrekombination beteiligt ist. Ergebnisse mit Hilfe von MAT-a^{inc} Mutanten (siehe oben) sprechen allerdings dafür, daß die Kreuzungstyp-Genkonversion das Resultat einer genetischen Transposition von den "stillen" Kopien auf dem MAT-Locus darstellt (Mascioli und Haber 1979). Für die Auslösung dieses Vorganges scheint der physikalischen Berührung der beiden loci eine größere Rolle zu zukommen als einem diffundierbarem Genprodukt.

Trotz dieser einfachen Erklärungsmöglichkeit hat der Kreuzungstyp-Genkonversionmechanismus eine wahrscheinlich komplexere Grundlage. Dies ist daran ersichtlich, daß Mutationen, die die Frequenz der Kreuzungstypkonversion beeinflußen, meist eine "Richtung" der Konversion bevorzugen (a nach α oder α nach a); eine identische Auswirkung derartiger Mutationen ist dagegen nie zu beobachten (Malone und Esposito 1980, Haber et al. 1980), was vermuten läßt, daß auch der Mechanismus der Konversion, in Abhängigkeit von der "Richtung", unterschiedlich ist (HML in MAT bzw. HMR in MAT).

Die Vermutung, daß es sich bei der Kreuzungstyp-Konversion um einen der bakteriellen Transposition analogen Mechanismus handeln könnte (Shapiro 1979, Cohen und Shapiro 1980), ließe sich zwar durch einzelne Ergebnisse der oben dargestellten Befunde erklären, doch sind in zusammenfassender Sicht die Unterschiede beider Systeme größer als ihre Gemeinsamkeiten. Es kann daher gesagt werden, daß das von Hicks und Mitarbeitern postulierte Kassetten-Modell die geringste Unwahrscheinlichkeit aufweist, da nicht nur formalgenetische, sondern auch molekulare Daten diese Hypothese unterstützen. Hier ist vor allem der Nachweis zu nennen, daß sich in jedem Hefegenom neben der exprimierten auch die komplementäre, jedoch nicht exprimierte Kreuzungstypinformation befindet (Klar et al. 1979).

Vergleicht man, wie oben hingewiesen, das bisher über die Kreuzungstypkonversion Bekannte mit der Transposition, so fallen die folgenden Divergenzen auf, die einen gemeinsamen Mechanismus unwahrscheinlich erscheinen lassen:

(1) Die Kreuzungstypkonversion ist mit einem spezifischen Locus (MAT) verknüpft, während die bakteriellen Transposone an mehreren Stellen der Rezipienten-DNA inserieren können. (2) Auf Grund des derzeitigen Kenntnisstandes ist es unwahrscheinlich, daß HML bzw. HMR für einen Faktor kodiert, der für die Genkonversion verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu ist z.B. für die bakterielle Transposition eine Transposase erforderlich. (3) Während bei Hefen die Frequenz der Rekombination und der Kreuzungstypkonversion offenbar von identischen genetischen Faktoren beeinflußt wird, ist dies bei Bakterien nicht der Fall. So zeigen z.B. rec⁻ - Stämme von E.coli, deren Rekombinationsfrequenz gestört ist, keine Änderung der Transpositionsfrequenz.

Was den Zeitpunkt der Kreuzungstypkonversion im Laufe des Entwicklungs-Zyklus der Hefe betrifft, so ist das "Umspringen" offenbar kein zufälliger Prozeß, sondern an ganze bestimmte Zellteilungsphasen gebunden, nämlich die G1 und S-Phase (Strathern und Herskowitz 1979). Dabei "springen" nur Zellen um, die sich schon geteilt haben ("experienced cell"); ist allerdings nach erfolgter Plasmo- und Karyogamie der diploide Zustand erreicht, kann keine Konversion mehr festgestellt werden (Strathern et al. 1979, Klar et al. 1979).

Über die Regulation von kreuzungstypbedingten Funktionen, wie z.B. die Produktion von Sexuallockstoffen (α- bzw. a-Pheromone), durch den MAT-Locus, ist nur wenig bekannt. Allerdings konnten Strathern et al. (1981) aus α-Zellen zwei spezifische m-RNA isolieren (α1 und α2), wobei offenbar das α1 Transkript die α-Zellfunktionen induziert, das α2-Transkript dagegen die a-Zellfunktionen reprimiert, wodurch derartige Zellen phänotypisch α sind. Diese sogenannt "α1- α2 Hypothese" (siehe Abb. 2) wurde bisher für α Zellen postuliert. Kürzlich konnte in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden (Sprague et al. 1983), daß das α1 Transkript für die Expression eines α-spezifischen Sterilgens (STE3) notwendig ist, was die Induktor-Funktion von MAT α1 evident macht.

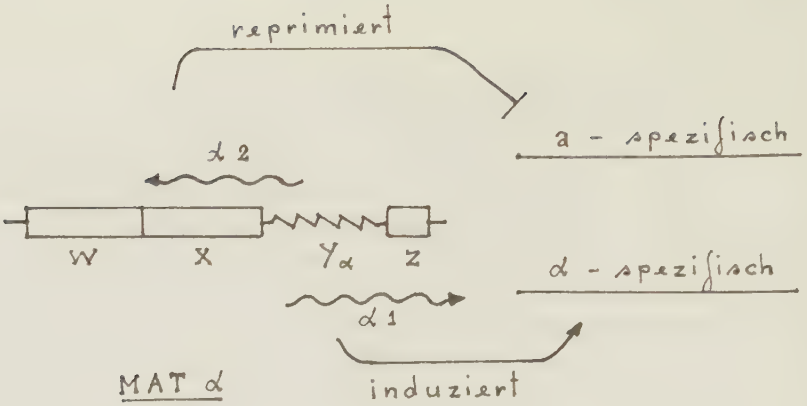


Abb.2: "α1-α2 Hypothese" für die phänotypische Expression von α-spezifischen Zellfunktionen. W, X und Z stellen die bei MATa und MATα homologenen Bereiche dar, Yα den heterologen Bereich, α1 und α2 die beide Transkript-Bereiche (siehe dazu auch Abb.1).

3. Weitere Kerngene, die den Kreuzungstyp-Komplex, oder das HC-Gen regulieren

Bei S.cerevisiae konnten Mutanten verschidene Klassen isoliert werden, die die Fusion bzw. Sporulationseingenschaften beeinträchtigen, meist jedoch nicht mit dem MAT-Locus gekoppelt sind. Da die Ausprägung des Kreuzungstyp der Zellen von solchen Genmutationen abhängig ist, (in a-, α- oder a/α-Zellen verhalten sich solche Mutationen auch wenn sie identisch sind, unterschiedlich) kann gefolgert werden, daß die Expression des Kreuzungstyp-Komplexes von diesen Genen reguliert wird. Der Übersichtlichkeit halber wird auf diese Gene, die für die Expression des Sexualzyklus verantwortlich sind nicht näher eingegangen, sondern sie sollen nur mit ihrer Funktion in Tab.3 aufgelistet werden.

Gen	Abkürzung von		Funktion	Referenz
CMT	Change of Mating Type	(CMT)	negativer Regulator für HML und HMR	Hopper und Hall 1975
CSP	Control of Sporulation	(CSP)	Sporulation a/a- bzw. α/α -Diploiden	Hopper und Hall 1975
DMT	Dual-Mating Type	(dmt)	Fusion von a/α -Diploiden mit a- bzw. α-Haploiden	Blamire 1975 Blamire und Melnick 1975
KAR	KARyogamy	(KAR)	Karyogamie	Conde und Fink 1976 Sena 1982
MAR	Mating Type Regulator	(mar)	Expression der "stillen-Allele" HML und HMR	Klar, Fogel, McLeod 1979, Klar et al. 1981, Nasmyth, Abraham 1982
RAD	RADiation sensitive	(rad)	reprimiert die Kreuzungstyp-Konversion	Malone, Esposito 1980 Cooper 1981, Malone 1982
RME	Regulation of MEiosis	(rme)	Meiose und Sporulation von a/a bzw. α/α Diploiden	Kassir und Simchen 1976
SCA	Sporulation CApable	(sca)	Meiose und Sporulation von a/a bzw. α/α Diploiden	Gerlach 1974
SIR	Silent Information Regulator	(sir)	Expression der "stillen Allele" HML bzw. HMR	Rine et al. 1979 Hicks et al. 1982
SWI	SWItching mating type	(swi)	Reduktion der Kreuzungstyp-Genkonversionfrequenz	Haber und Garvik 1977
STK	STucK mutant	(STK)	Reduktion der Konversion von MATa zu MAT α	Haber et al. 1980

Tab. 3 : Zusammenstellung von Kern-Genen bei S.cerevisiae, die den Kreuzungstyp-Komplex (HML, HMR, MAT) oder das HO-Gen regulieren.

c. Kreuzungstyp-Konversion bei Schizosaccharomyces pombe

Vergleichbar der Bäckerhefe S.cerevisiae gibt es auch bei der Spalthefe Schizosaccharomyces pombe sowohl homothallische als auch heterothallische Stämme, wobei beide Typen in der Lage sind, miteinander bzw. untereinander zu fusionieren und in der Folge Asci mit je vier Ascosporen auszubilden (Bresch et al. 1968, Gutz und Doe 1973, Meade und Gutz 1978, Egel 1976 a).

Die Kreuzungstyp-Konversion beträgt bei heterothallischen Stämmen 10^{-4} pro Zellteilung (Egel 1976 a, 1976 b). Bei entsprechenden Untersuchungen des homothallischen Stammes h^{90} stellte sich jedoch heraus, daß es sich eigentlich um einen heterothallischen Stamm mit extrem hoher Kreuzungstyp-Konversionsfrequenz handelt, nämlich 10^{-1}. Bedingt durch dieses permanente "Umspringen" sind die beiden Kreuzungstypen nicht nachweisbar, wodurch scheinbar eine Selbstung erfolgt. Vor allem aufgrund von formalgenetischen Untersuchungen an diesem h^{90} Stamm postulierte Egel (1977 a, b, c) das sogenannte "Flip-Flop-Modell". Nach dieser Vorstellung besitzt jeder Stamm beide Kreuzungstyp-Informationen (hier als M und P bezeichnet), die durch ein Promotor-Element (Flip-Flop-Element) voneinander getrennt sind. Dieser Promotor kann durch Umspringen die Leserichtung der Polymerase bestimmen, wodurch entweder das Segment M (=Minus) oder das Segment P (=Plus) exprimiert wird (siehe Abb.3).

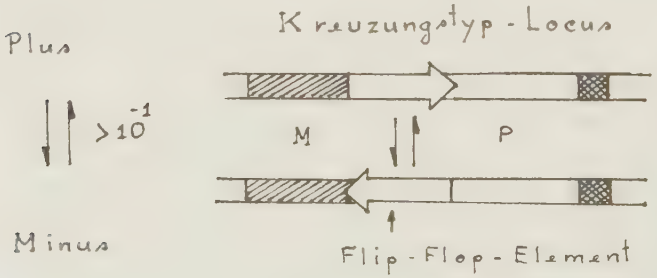


Abb.3: Flip-Flop-Modell der Kreuzungstypkonversion bei S.pombe (nähere Erklärungen im Text).

Obwohl dieses Modell durch seine Logik, vor allem jedoch durch seine Einfachkeit besticht, besitzt es doch entscheidende Unzulänglichkeiten. So kann z.B. mit diesem Modell die Beobachtung nicht in Einklang gebracht werden, daß die Frequenz des Kreuzungstyp-Umspringens offenbar von einem Gen (smt= switching signal at the mating type) reguliert wird, das eng an dem Kreuzungstyp-Locus gekoppelt ist (Egel und Gutz 1981).

Klone, die ein mutiertes smt-Gen tragen, zeigen nach Jod-Bedampfung ein "gesprenkeltes" ("speckled") Aussehen. Im Prinzip ist dieses Gen mit dem HO-Gen bei S.cerevisiae vergleichbar, da es auch die Frequenz mitotischer Crossingover in der Umgebung des Kreuzungstyp-Locus reguliert (Egel 1981, Egel und Gutz 1981).

In Konsequenz dieser Beobachtung, vor allem jedoch an Hand von sehr genauen rekombinationsgenetischen Kartierungen des Kreuzungstyp-Bereiches, postulierte Egel (1981) einen "Umspring"-Mechanismus, der dem "Kassetten-Modell" sehr ähnlich ist (siehe Abb.4). Grundlage ist auch bei diesem Modell eine Transposition von "stillen" Kreuzungstyp-Informationen, wodurch sie aktiviert werden (Egel 1981, Egel und Gutz 1981). Der molekulare Nachweis dieses Postulates gelang durch Deletion des Plus-Bereiches, wodurch ein stabiler Minus-Klon entstand (Beach, Nurse und Egel 1982); erst durch Transfer des isolierten (klonierten) Plus-Bereiches in diesen Klon, konnte das "Umspringen" des Kreuzungstypes induziert werden.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, tragen die "Allele" mat2 und mat3 die "stillen" Informationen für den Kreuzungstyp P (Plus) bzw. M (Minus); die Transposition ,die von dem Gen smt reguliert wird, erfolgt auf dem Kreuzungstyp-Locus mat1.

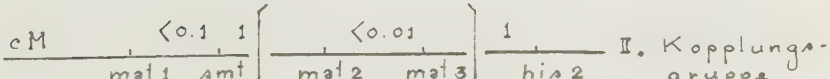


Abb. 4: Genkarte des Kreuzungstyp-Komplexes von Sch.pombe; die Abstände der einzelnen Loci sind in Centi-Morgan (cM) angegeben. (nähere Erläuterungen siehe Text).

B. Austausch genetischer Information via Protoplasten

Der Austausch genetischer Information wird durch sexuelle oder parasexuelle Vorgänge ermöglicht. Der sexuelle Vorgang ist definiert als eine Aufeinanderfolge von Karyogamie und Meiose, in der sich eine Neuordnung und Umgestaltung der Chromosomen (Rekombination) vollzieht. Er ist auf eukaryotische Organismen beschränkt. Parasexuelle Vorgänge dagegen umfassen alle nicht meiotischen Rekombinationen wie z.B. Konjugation, Transduktion, Transformation oder mitotische Rekombination und werden sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten gefunden (Esser und Stahl 1981).

Voraussetzung für alle Rekombinationsvorgänge ist ein Austausch von genetischer Information über Zellgrenzen, was meist durch Zellfusion (spontan oder erzwungen) induziert wird. Bedingt durch Inkompatibilitäts-Phänomene unterschiedlicher genetischer Grundlagen,läuft dieser Prozeß jedoch nicht willkürlich ab, sondern nur zwischen Zellen, die offenbar auf Grund von bestimmten Zellwanddeterminanten zueinander passen. Im Labor lassen sich solche zellwandbedingten Inkompatibilitätssperren durch Verwendung von Protoplasten überwinden.

> Ein Protoplast ist eine voll funktionsfähige zellwandlose Zelle, die sich aus einer Pflanzen- oder Mikroorganismenzelle mit Hilfe eines Zellwand-abbauenden Enzyms (z.B. Cellulase, Chitinase, Mannase, Glucanase etc.) in einer geeigneten stabilisierten Pufferlösung (z.B. in KCL, Sorbitol, Mannitol) herstellen läßt (ausführliche Informationen siehe Peberdy 1979, Arnold 1981).

Der verwandte Begriff "Sphaeroplast" ist für osmotisch empfindliche Zellen definiert, die noch Teile der Zellwand besitzen. Sphaeroplasten und Protoplasten lassen sich nur durch elektronenmikroskopische Beobachtungen voneinander unterscheiden, im normalen Lichtmikroskop erscheinen sie identisch (Arnold 1981).

1. Protoplastenfusion

a. Grundlagen

Protoplasten fusionieren nur sehr selten spontan, da dieser Vorgang durch die negative Ladung der Phospholipide

und anderer Komponenten der Zellmembran verhindert wird. Bei geringem Abstand zwischen den Membranen zweier Zellen treten elektrostatische Abstoßungskräfte auf, die durch Verwendung inaktivierter Viren oder durch bestimmte Chemikalien wie z.B. Polyethylenglycol (PEG) ausgeschaltet werden können.

Kao und Michayluk (1974) setzten zum ersten Mal PEG als fusionsvermittelnde Substanz bei pflanzlichen Protoplastenfusionen ein. Dieses Fusogen wird heute universell zusammen mit Calcium-Ionen für eine erfolgreiche Protoplastenfusion bei Pilzen (Hyphenpilz und Hefen), Streptomyceten und verschiedensten Bakterien verwendet (Anné und Peberdy 1975, 1976; Ferenczy et al. 1976; Solingen und van der Plaat 1977; Frehel et al. 1979; Gusson 1980). Fowke et al. (1975) konnten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bei einer Protoplastenfusion zwischen Pisum sativum und Vicia faba nachweisen, daß durch PEG eine Protoplasten-Agglutination induziert wird. Die Agglutination umfaßt relativ große Bereiche der Protoplasten-Oberfläche, während Stellen fester Adhäsionen-die potentiellen Stellen für eine Fusion- nur auf kleine Bereiche begrenzt sind.

Die Funktionsweise von PEG ist noch nicht exakt geklärt. Elektronspin-Resonanz-Messungen an menschlichen Erythrozyten-Membranen und Liposomen in PEG-Lösungen ergaben, daß PEG mit der Lipiddoppelschicht reagiert und den physikalischen Status der Membranproteine verändert. Es wird angenommen, daß es zu lokalen Instabilitäten in der Membran kommt, die für eine Membranfusion günstige Bereiche entstehen lassen (Surewicz 1983).

Die Fusionsrate der Protoplasten bei Hyphenpilzen (z.B. Aspergillus, Penicillium etc.) beträgt in Gegenwart von PEG und $CaCl_2$ (30-50 % w/v PEG; 10-100 mM $CaCl_2$) im allgemeinen 10^{-1}-10^{-2} für Intraarten- und 10^{-3}-10^{-4} für Interarten-Fusionen (Dales und Croft 1977; Anne und Peberdy 1976; Kevei und Peberdy 1979; Anné 1982 a, b). Im Vergleich dazu findet man für Hefen einer Art Fusionsraten von ca. 10^{-3}-10^{-5} und für verschiedene Arten Raten von ca. 10^{-5}-10^{-6} (Fournier 1977; Sarachek 1981; Provost et al. 1978; Wilson et al. 1982).

Darüber hinaus sind gerade in jüngster Zeit

Verfahren entwickelt werden, die noch höhere Fusionsraten ermöglichen. Ein solches Verfahren ist der Einschluß von Protoplasten in Calcium-Alginat-Gelkügelchen (Vidoli et al. 1982 a), wodurch z.B. bei der Hefe Schwanniomyces alluvius die Fusionsfrequenz um einen Faktor von Tausend erhöht werden konnte (Vidoli et al. 1982 b). Besonders vielversprechend, da universell anwendbar, sind Fusionen im elektrischen Feld. Wie Untersuchungen z.B. bei menschlichen Erythrozyten (Scheurich und Zimmermann 1981 a) oder bei pflanzlichen Protoplasten (Scheurich und Zimmermann 1981 b, Zimmermann und Scheurich 1981 a, 1981 b) gezeigt haben, sind Fusionsraten bis zu 100 % erreichbar. Auch bei Pilzen, wie z.B. bei Dictyostelium discoideum (Neuman et al. 1980) oder bei S.cerevisiae (Weber et al. 1981, Halfmann et al. 1982, Halfmann et al. 1984) konnte diese Fusionsmethodik mit Erfolg angewendet werden. Sie hat außerdem den Vorteil, daß der Fusionsvorgang direkt unter dem Mikroskop kontrolliert werden kann, was im Vergleich zur PEG-Technik zu sehr gut reproduzierbaren Ergebnissen führt (Pilwat et al. 1981, Zimmermann und Vienken 1982).

Der der elektrischen Fusion zugrunde liegende Mechanismus beruht auf einem dielektrischen Durchbruch der Zellmembran. In der Membran entstehen Löcher, die so groß sind, daß Moleküle in der Größe eines Gens bis zur Organelle hindurchgeschleust werden können. Im Gegensatz zur PEG-Methode ist die Störung der Membranstruktur durch den elektrischen Impuls nur auf die Membrankontaktzone zweier Protoplasten beschränkt und innerhalb weniger Sekunden bis Minuten bei erhöhten Temperaturen (z.B. 37°C) ausheilbar. Die Folge ist ein geringer Verlust von intrazellulären Substanzen und eine erhöhte Zahl nach der Fusion lebensfähiger Zellen.

b. Anwendung

Was die Anwendung der "Protoplastentechnik" betrifft, so konnten bei Pilzen die unterschiedlichsten genetischen Informationen miteinander kombiniert werden. Im Rahmen vorliegender Arbeit sollen daraus nur einige Aspekte heraus gegriffen werden; eine Zusammenstellung der bisher erfolgreich durchgeführten Protoplastenfusionen ist in Tab. 4 gegeben.

Bei Hefen konnte z.B. festgestellt werden, daß sich auch Protoplasten mit identischen Kreuzungstypen fusionieren lassen, und dadurch Diploide (a/a bzw. α/α) Klone entstehen. Da ohne Entfernung der Zellwände (durch Zellfusion) ausschließlich a/α Diploide entstehen können, wird deutlich, daß der Kreuzungstyp die Ausprägung von Zellwanddeterminanten reguliert, die bei der Zellerkennung eine Rolle spielen (van Solingen und van de Plaat 1977, Stahl 1978, Broock et al. 1983).

Wurden solche diploiden Klone mit Protoplasten entgegengesetzten Kreuzungstyps fusioniert, so tritt auch ohne Kernverschmelzung Ascosporenbildung auf, was beweist, das zur Auslösung einer sexuellen Differenzierung schon ein Plasmakontakt der beiden Kreuzungspartner genügt (Tsuboi 1981 a, 1981 b).

Durch die Fusion von Protoplasten ist es auch möglich geworden, Hyphenpilze (Aspergillen und Penicillien), die normalerweise keine genetischen Austauschvorgänge zeigen, miteinander zu rekombinieren, wobei besonders die Erstellung von Interarten- bzw. Intergattungs-Hybriden weitreichende Konsequenzen hat (Anne und Peberdy 1981, Anne 1982 a, 1982 b, Evans et al. 1982), diese nicht nur auf Grund der Anwendungsmöglichkeit im Rahmen der Optimierung von Industriestämmen, sondern vor allem, weil dadurch die gegenseitige Beeinflussung von genetischen Systemen unterschiedlicher evolutiver "Höhe" ersichtlich gemacht werden kann (Dales und Croft 1977, Ferenczy et al. 1975).

Außer der genetischen Rekombination zwischen Kerngenen läßt sich durch Protoplastenfusionstechnik auch die Rekombination von mitochondrialer DNA induzieren. So gelang es Earl und Mitarbeiter (1981) mit Hilfe dieser Technik zu zeigen, daß das Chondriom von Hybriden aus Aspergillus nidulans und Aspergillus echinulatus eine intermediäre Charakteristik aufweist (sowohl was das Restriktionsmuster als auch die Länge betrifft). Die Rekombination erfolgt dabei immer nur an homologen Bereichen des Chondrioms, wie bei der Hefe Torulopsis glabrata gezeigt (Sriprakash und Batum 1981). Bei S.pombe dagegen

kann die Rekombination sowohl homolog als auch heterolog erfolgen, sodaß bei einer Restriktionsanalyse der mtDNA derartige Hybridmuster bzw. Fragmente entstehen, die entweder den beiden Eltern-Chondriomen vergleichbar sind (homolog) oder solche, die weder bei dem einen, noch bei dem anderen Elter auftraten (heterolog). In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung interessant, daß unterschiedliche Chondriome in Hybridzellen nicht koexistieren können (Wolf 1982).

Organismus	Referenz
Intraspezifisch	
Aspergillus fumigatus	Ferenczy et al. 1977
Aspergillus nidulans	Dales und Croft 1977, Ferenczy et al. 1975, 1977, Anne und Peberdy 1976, Ferenczy et al. 1977
Aspergillus niger	Ferenczy et al. 1977, Das 1980
Candida albicans	Sarachek et al. 1981, Sarachek und Rhoads 1981, Poulter et al. 1981, Pesti und Ferenczy 1982, Evans et al. 1982
Candida tropicalis	Fournier et al. 1977, Vallin und Ferenczy 1978
Cephalosporium acremonium	Anne und Peberdy 1976, Hamlyn und Ball 1979
Geotrichum candidum	Ferenczy et al. 1974
Kluyveromyces lactis	Allmark et al. 1978, Morgan et al. 1980
Mucor pusillus	Ohnuki et al. 1982
Mucor racemosus	Genthner und Borgia 1978
Penicillium chrysogenum	Anne und Peberdy 1976
Penicillium patulum	
Penicillium roquefortii	
Phycomyces blakesleanus	Binding und Weber 1974
Rhodosporidium toruloides	Sipiczki und Ferenczy 1977
Saccharomyces cerevisiae	Svoboda 1976, Ferenczy und Maraz 1977, Yamamoto und Fukui 1977, van Solingen und van der Plaat 1977, Gunge und Tamaru 1978, Arima und Takano 1979, Tsuboi 1981a, b

Organismus	Referenz
	Weber et al. 1981, Halfmann et al. 1982, Halfmann et al. 1983, Broock et al. 1983
Saccharomycopsis lipolytica	Stahl 1978
Schizosaccharomyces pombe	Sipiczki und Ferenczy 1977
Schwanniomyces alluvius	Wilson et al. 1982, Vidoli et al. 1982
Torulopsis glabrata	Galeotti et al. 1981, Sriprakash und Batum 1981
Interspezifisch	
A.nidulans X A.fumigatus	Ferenczy et al. 1977
A.nidulans X A.rugulosus	Kevei und Peberdy 1977, 1979
C.albicans X C.tropicalis	Kucsera und Ferenczy 1979
K.lactis X K.fragilis	Whittaker und Leach 1978
M.pusillus X M.miehei	Ohnuki et al. 1982
S.montanus X S.diastaticus	Spencer und Spencer 1981
S.rosei X S.cerevisiae	
Sch.pombe X Sch.octosporus	Sipiczki 1979
P.chrysogenum X P.cyaneofulvum	Peberdy et al. 1976
P.chrysogenum X P.cyclopium	Anne 1982a
P.chrysogenum X P.lanosum	
X P.nigricans	
X P.notatum	Anne und Peberdy 1976
X P.patulum	Anne 1982a
X P.roquefortii	Anne et al. 1976, Anne und Peberdy 1981
X P.stoloniferum	Anne 1982b
X P.verrucosum	Anne 1982
X P.cyaneofulvum	Anne und Eyssen 1978
Intergenerisch	
C.tropicalis X P.guilliermondii	Vallin et al. 1979
C.tropicalis X S.fibuligera	Provost et al. 1978
C.pseudotropicalis X S.pombe X S.cerevisiae	Spencer und Spencer 1981
H.anomala X S.diastaticus	
H.capsulata X S diastaticus	
Lodderomyces elongiosporus X Sac.lipolytica	Weber und Spata 1980
P.membranaefaciens X S.diastaticus	Spencer und Spencer 1981
S.cerevisiae X Sch.pombe	Svoboda 1980
S.diastaticus X Sch.pombe	Tamaki 1982
Sch.pombe X Octosporomyces japonicus	Kosikov und Medvedeva 1977
Yarrowia lipolytica (Sac. lipolytica) X K.lactis X S.diastaticus	Groves und Oliver 1982

Tab. 4: Austausch genetischer Information durch Protoplastenfusion bei Pilzen (erweitert nach Esser und Stahl 1981)

2. Protoplasteninfektion

Eine zweite Möglichkeit, über Protoplasten genetische Information auszutauschen, ist die Protoplasteninfektion. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, gezielt genetisches Material des Zytoplasmas oder des Kerns in die Zellen einzuführen. Man unterscheidet vier Typen der Protoplasteninfektion:

1. mit gereinigter DNA bzw. Plasmiden,
2. mit Liposomen "verpackter" DNA,
3. mit isolierten Kernen,
4. mit isolierten Mitochondrien.

a. Protoplasteninfektion von Hefen mit nackter DNA (Transformation)

Die Methode der Transformation konnte bei der Hefe S.cerevisiae 1978 erstmals erfolgreich durchgeführt werden (Hinnen et al. 1978, Beggs 1978).

Bei den DNA-Klonierungen im Hefesystem kann man entsprechend dem Ursprung der transformierenden DNA zwischen homologen und heterologen Transformationen unterscheiden. Während die Transformation im homologen System die Übertragung von DNA innerhalb einer Art bedeutet, werden bei heterologen Transformationen Art- oder Gattungsgrenzen überschritten.

Eine wichtige Voraussetzung waren genetisch definierte Rezipienten-Stämme und die Existenz einer Hefe-endogenen extrachromosomalen DNA, der 2 µm-DNA, die als Vektor für den DNA-Transfer benutzt werden konnte.

Die Verwendung von selbst-replizierenden Einheiten, sogenannte Replikonen, in der DNA-Klonierung erwies sich gegenüber chromosomal integrierenden Molekülen als vorteilhaft, da sie eine Transformationsrate und eine leichte Reisolation von klonierten Fragmenten gewährleisten. Neben dem Replikon der 2 µm-DNA ist heute der Einsatz von chromosomalen Replikationsursprüngen gebräuchlich (Struhl et al. 1979). Eine Optimierung der Stabilität solcher Plasmide konnte zudem durch die gleichzeitige Klonierung von Centromersequenzen erreicht werden (Clarke und Carbon 1980).

So konnten zahlreiche Gene von Hefe und anderen Eukaryonten durch Komplementation von Auxotrophien oder Assimilationsdefekten isoliert werden. Einen Über-

Eine Liste der bisher nachgewiesenen Expression von prokaryotischen und eucaryotischen Genen in Hefen gibt Tab. 5.

Inzwischen konnte auch für weitere Hefen außer Saccharomyces ein Transformations- und Klonierungssystem entwickelt werden, so z.B. für die Spalthefe Schizosaccharomyces pombe (vergleiche Tab. 5).

Wirtsorganismus	Isolierte Gene von	Gen, Genprodukt bzw. Gen-Funktion	Referenz
1. homologes System			
Saccharomyces cerevisiae	S.cerevisiae	Leu 2 (β-Isopropylmalat Dehydrogenase	Hinnen et al. 1978 Beggs 1978
		Ura 3 (Orotidine-5' Monophosphat Decarboxylase	Blanc et al. 1979
		Trp 1 (N 5-Phosphoribosyl-antranilat Isomerase)	Walz et al. 1978
		Trp 2 (Anthranilatsynthase)	Aebi et al. 1982
		Trp 3 (Indol-3 Glycerol-Phosphat-Synthase)	Aebi et al. 1982
		arg 3 (Ornithin Carbamoyltransferase	Crabeel et al. 1981
		ADH (Alkohol-Dehydrogenase)	Williamson et al. 1980 Bennetzen und Hall 1982
		RAD 52 (Rekombination und DNA-Reparatur)	Schild et al. 1983
		MAT (Paarungstypgen)	Hicks et al. 1979
		CBP 1(Gen für korrektes Processing der Apocytochrom b-mRNA)	Dieckman et al.1981

Wirtsorganismus	isolierte Gene von	Gen, Genprodukt bzw. Gen-Funktion	Referenz
		OP 1 (oxidative Phosphorylierung)	O'Malley et al. 1982
		PPR 1 (Pyrimidin-Stoffwechsel-Regulation)	Losson und Lacroute 1981
		CYH 2 (Cycloheximid-Resistenz)	Käufer et al. 1983
		STE 3 (α-spezifischer Gen-Regulator)	Sprague et al. 1983
Schizosaccharomyces pombe	S. pombe	mat 2-P (Kassette Plus-Information für den Paarungstyp)	Beach et al. 1982
2. heterologes System S. cerevisiae	Escherichia coli	Penicillinase	Chevallier und Aigle 1979
		β-Lactamase	Roggenkamp et al. 1981
		Kanamycin-Resistenz, G 418-Resistenz	Jimenez und Davies 1980
		Chloramphenicol-Resistenz, Ampicillin-Resistenz	Hollenberg 1979
		Chloramphenicol-Resistenz	Cohen et al. 1980
		β-Galactosidase (lac Z-Gen)	Panthier et al. 1980
	Klebsiella pneumoniae	Nif-Gene (Stickstoffixierungs-Gene)	Gerbaud et al. 1981 Zamir et al. 1981
	Kluyceromyces lactis	β-Galactosidase	Dickson 1980

Wirtsorganismus	isolierte Gene von	Gen, Genprodukt bzw. Gen-Funktion	Referenz
	Saccharomyces carlsbergensis	MAL-6 (Maltose)	Federoff et al. 1982
	Huhn	OLP (Ovalbumin-ähnliches Protein)	Mercereau Puijalon et al. 1980
	Drosophila melanogaster	ADE 8 (Adenin-Synthese)	Henikoff et al. 1981
	Mensch	LeIF-D (Leukozyten Interferon D)	Hitzeman et al. 1981
		IFN-α1, IFN-α2, IFN-γ (Menschliche Interferone) IFN-α2	Hitzeman et al. 1983 Dobson et al. 1983
S.pombe	S.cerevisiae	Leu 2 (β-Isopropylmalat-Dehydrogenase)	Beach und Nurse 1981

Tab. 5: Überblick über bisher nachgewiesene Expression von prokaryotischen und eukaryotischen Genen in Hefen. (ergänzt nach Esser und Lang-Hinrichs 1983).

b. Weitere Möglichkeiten der Protoplasteninfektion (Transformation) von Hefe

Neben Transformation mit isolierter, nackter DNA sollen hier drei weitere Systeme der parasexuellen Rekombination erwähnt werden.

Die Verpackung von nackter DNA (Vektor-DNA) in künstliche Phospholipid-Membranen wird als Liposomen-Technik bezeichnet und ist bei verschiedenen Organismen erfolgreich bei der Entwicklung und Optimierung eines Transformationssystems genutzt worden.

Detaillierte Angaben zur Herstellung von Liposomen und weitere Anwendungsmöglichkeiten können den Arbeiten von Gregoriadis (1980) Megee (1980) und Büschl et al. (1982) entnommen werden. Die Methodik der Protoplasten-Liposomen-Fusion ist angelehnt an die der Protoplasten-Fusion und basiert auf der Wirkung von Polyethylenglykol und Calciumchlorid.

Entscheidende Vorteile der Technik im Bereich der Gen-Klonierung liegen in der Schutzwirkung der Membranen, die verhindern, daß die transformierende DNA von extrazellulären DNasen der Rezipientenzellen abgebaut wird; außerdem ist gegenüber der normalen Transformation eine gesteigerte Transformationsrate bei der Fusion zwischen Liposomen und Protoplastenmembran zu beobachten.

So konnten bei pflanzlichen Protoplasten, deren DNase-Exkretion die Transformation mittels nackter DNA deutlich beeinträchtigt (Lurquin und Kado 1977, Hughes, White und Smith 1977), mit Hilfe der Liposomen-Technik eine stark erhöhte Transformationsfrequenz erreicht und die Integration von Fremd-DNA in das Kerngenom nachgewiesen werden (Lurquin 1979).

Als weiteres Beispiel soll hier das Transformationssystem für Neurospora crassa genannt werden, wo mittels nackter DNA Raten von 5-30 Transformanten/µg DNA erreicht werden (Case et al. 1979). Diese Frequenz ließ sich bei dem Einsatz von Liposomen-verpackter DNA auf das 20-40-fache erhöhen (Radford et al. 1981).

Die Anwendung dieser Technik bei der Transformation von S.cerevisiae oder anderen Hefen konnte bisher noch nicht beschrieben werden, doch bieten sich auch hier Einsatzmöglichkeiten z.B. bei der Etablierung neuer Rezipientensysteme mit geringer Transformationseffizienz an.

Ein weiteres System der parasexuellen Rekombination stellt die Fusion von Protoplasten mit isolierten Kernen dar. Diese Methode sollte dann von Vorteil sein, wenn die Interaktion von Kerngenomen getrennt von cytoplasmatischer genetischer Information analysiert werden oder wenn der Transfer von einzelnen Chromosomen verfolgt werden soll.

Die Fusion von haploiden Protoplasten und isolierten diploiden Kernen führte, wie Becher und Mitarbeiter (Becher et al. 1982) zeigen konnten, zu heterozygoten

Fusionsprodukten. Die Untersuchung des DNA-Gehaltes der Hybriden und die Einzelsporanalyse ergaben Unterschiede in der Integrationsfähigkeit und der Stabilität für einzelne transferierte Chromosomen in den Rezipientenzellen.

Die dritte hier zu nennende Sonderform der parasexuellen Rekombination ist die Fusion von Protoplasten mit isolierten Mitochondrien.

Aufgrund der Polyploidie der cytoplasmatischen genetischen Information-eine haploide Hefezelle besitzt im Durchschnitt 50 mtDNA-Moleküle- ist eine quantitative Analyse der Übertragung, Rekombination und Segregation der mitochondrialen Gene nach Rekombination durch Kreuzung äußerst schwierig. Die Übertragung von isolierten Organellen vereinfacht eine solche Analyse und schließt zudem die Wirkung von Kerngenen auf das Rekombinationsverhalten der Organellen aus (Tudzynski und Vornberger 1980).

Rein mitochondriale Rekombination ist in einigen Ausnahmefällen auch bei Kreuzung oder Fusion ganzer Zellen möglich. So erfolgt bei der Verwendung der Kernmutante kar 1 von S.cerevisiae (Conde und Fink 1976, Sena 1982, Goodey und Beran 1983) und unter bestimmten Versuchsbedingungen bei der schon beschriebenen Elektrofusion von Protoplasten (Halfmann et al. 1982) keine Kernfusion.

Die Produkte solcher Fusionen und Rekombinationen werden je nach Zusammensetzung ihrer cytoplasmatischen genetischen Information als "Cybride" oder als "Cytoductants" bezeichnet. "Cybride" oder "cytoplasmatische Hybride" besitzen ein haploides Kerngenom eines Elters und rekombinierte cytoplasmatische Genome von zwei Eltern (Bunn und Wallace 1974, Goodey und Berans 1983). "Cytoductants" dagegen tragen das haploide Kerngenom eines Elters und cytoplasmatische Genome des anderen Elters (Lancashire und Matoon 1979).

Die Rekombinationsfrequenz der mitochondrialen Gene (Resistenzmarken) ist, wie Maraz und Subik (1981) für S.cerevisiae und Lückemann, Sipicski und Wolf (1979) für S.pombe zeigen konnten, unabhängig von der Fusionsmethode und somit identisch für Fusionsprodukte nach sexuellen und parasexuellen Rekombinationen.

Für die Fusion von Organellen mit Protoplasten werden neben isolierten Mitochondrien (z.B. Gunge und Sakaguchi 1979) auch sogenannten "Miniprotoplasten" verwendet.

"Miniprotoplasten" entstehen durch enzymatische Abtrennung von sprossenden Hefezellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Gerade gebildete Sprosse besitzen dabei zwar Zellorganellen (Mitochondrien), sind jedoch kernlos, da sich die Kerne bei der Zellteilung langsamer in die neu gebildete Zelle bewegen als die Mitochondrien (Kopecka´et al. 1974).

Mit "Miniprotoplasten" konnte die Fusionsfrequenz von 10^{-7} auf 10^{-6} erhöht werden(Maraz und Ferenczy 1980, Fukuda und Kimura 1980), weil die Rate der Fusion größer ist als die Rate der zur Aufnahme von isolierten Mitochondrien nötigen Endocytose (Yoshida und Takeuchi 1980). Die Anwendung der Mitochondrien-Fusionsmethode beschränkt sich nicht auf homologe Rekombination, sondern ist auch in heterologen Systemen erfolgreich.

So beschrieben Yoshida (1979) und Yoshida und Takeuchi (1980) eine Mitochondrien-Übertragung zwischen S.cerevisiae als Rezipient und Hansenula wingei bzw. Schizosaccharomyces pombe als Spender. Die Fusionsprodukte zeigten phänotypisch eine Rekonstruktion der Atmungskompetenz und der Spektren von Cytochrom a und b. Ähnliche Ergebnisse beschrieben Yamashita et al. (1981) bei Fusionen von S.cerevisiae-Protoplasten und H.wingei-Miniprotoplasten. Sie untersuchten neben phänotypischen Marken den DNA-Gehalt der Hybride und konnten so bestätigen, daß die Miniprotoplasten-Technik zu haploiden und atmungsaktiven Hybriden führt.

C. Methylotrophe Hefen und deren Methanol-Stoffwechsel

Methanol wird in der chemischen Industrie heute vor allem aus Synthesegas preisgünstig und mit hohem Reinheitsgrad in großen Mengen gewonnen. Es bietet daher gute Voraussetzung, als C-Quelle in biochemischen Fermentationsprozessen eingesetzt werden zu können. Aus diesem Grund wird zukünftig auch dem Einsatz methylotropher Mikroorganismen in der Biotechnologie z.B. zur Gewinnung von Einzellerprotein (SCP-Produktion), von Aminosäuren, Antibiotika, Vitamine etc. eine wachsende Bedeutung zukommen (Cooney und Levine 1972, Wagner 1977, Rehm 1980, Dimmling und Sambeth

1981).

1. Methanol-verwertende Hefen

Methanolverwertende Hefen gehören zu den fakultativ methylotrophen Organismen, die nicht nur das C_1-Substrat Methanol, sondern auch Äthanol, Acetat, Glukose, Stärke etc. verwerten können. Dieser Organismengruppe stehen die obligat methylotrophen Bakterien gegenüber, die ausschließlich C_1-Verbindungen wie Methan, Methanol, methylierte Amine, Formaldehyd, Formiat etc. als Kohlenstoffquelle nutzen können.

Ogata und Mitarbeiter konnten im Jahr 1970 als erste eine methylotrophe Hefe (Kloeckera spec.) isolieren. Seit dieser Zeit wurde 28 verschiedene methylotrophe Hefen isoliert, die sich in 5 Gattungen systematisieren lassen: Es handelt sich um die zwei Ascomycet-Gattungen Hansenula und Pichia, sowie um drei imperfekte Hefen: Candida, Kloeckera, und Torulopsis. Nähere Hinweise sind der Tab.6 zu entnehmen.

Bedingt durch die enge phänotypische und stoffwechselphysiologische Korrelation methylotropher Hefen ist eine taxonomisch Abgrenzung schwierig. Lee und Komagata (1980 a) führten mit 27 Arten biologische und chemotaxonomische Untersuchungen, durch die sowohl allgemeine Kriterien der Hefetaxonomie als auch spezifische Merkmale methylotropher Hefen einschlossen (z.B. GC-Gehalt der DNA, Protonresonanzspektroskopie der Zellwand, Untersuchungen des Ubiquinon-Systems, elektrophoretische Muster der Methanoloxidase). Mit Hilfe dieser Methoden konnten sie Kloeckera spec. 2201, C.methanolica und C.koshuensis als C.boidinii identifizieren und die Gattungen Hansenula, Pichia, Candida und Torulopsis klar voneinander abgrenzen.

Crganismen	Isolationsursprung	Referenz
1.Candida		
C.boidinii	aus Erde, aus Kirschsaft	Sahm und Wagner 1972, Hazeu et al.1972, Kato et al.1974b, Lee und Komagata 1980a
C.cariosilignicola	verfallendes Holz	Lee und Komagata 1980b
C.methanolica	aus Tomaten und Azalee-Blüte	Oki et al.1972

Organismen	Isolationsursprung	Referenz
C.parapsilosis	Eigenisolat	Chaiprasert 1983
C.succiphila	Aprikosensaft	Lee und Komagata 1980b
2.Kloeckeria		
Kloeckera spec.	aus Erde	Ogata et al.1970
3.Torulopsis		
T.glabrata	aus Erde	Asthana et al.1971
T.methanolvescens	verfaulenden Tomaten	Oki et al.1972
T.molischiana	See-Wasser	Lee und Komagata 1980a
T.nagoyaensis		Asai et al.1976
T.nemodendra	CBS 6280	Lee und Komagata 1980a
T.nitratophila	CBS 2027	Hazeu et al.1972
T.pinus	CBS 970	Hazeu et al.1972
T.sonorensis		Miller et al.1976
4.Hansenula		
H.capsulata	CBS 1993	Hazeu et al.1972
H.glucozyma	CBS 5766	
H.henricii	CBS 5765	
H.minuta	CBS 1708	
H.nonfermentans	CBS 5764	
H.ofunaensis		Asai et al.1976
H.philodendra	CBS 6075	
H.polymorpha	CBS 4732 und aus Erde	Levine und Cooney 1973
H.wickerhamii	CBS 4307	Hazeu et al.1972
5.Pichia		
P.cellobiosa	aus Erde	Lee und Komagata 1980b
P.haplophila	CBS 704	Hazeu et al.1972
	aus Erde	Kato et al.1974b
	aus Erde	Jara et al.1983
P.pinus	CBS 744	Hazeu et al.1972
P.methanolica	aus Erde	Kato et al.1974b
P.trehalophila	CBS 5361	Hazeu et al.1972
		Lee und Komagata 1980a

Tab.6: Methanolverwertende Hefen (erweitert nach Lee und Komagata 1980 a).

2. Biochemische Regulation des Methanol-Stoffwechsels bei Hefen

a.Methanol-Dissimilation

Die Dissimilation erfolgt in fakultativ methylotrophen Hefen entsprechend dem Abbau in obligat methylotrophen Bakterien durch eine Oxidation des Methanols über Formaldehyd und Formiat zu CO_2 (Quayle 1972, Übersicht Metha-

nol-Assimilation bei Hefen Reuß et al. 1974, Wagner 1977, Sahm 1977, 1979, Tani et al. 1978).

Die biochemische Regulation der Methanol-Dissimilation in Hefe ist vor allem bei Candida boidinii und Hansenula polymorpha gut untersucht (Sahm und Wagner 1972, 1973, Levine und Cooney 1973). Der erste Umsetzungsschritt besteht in einer Oxidation des Methanols zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid nach folgender Gleichung:

$$CH_3CH + O_2 \longrightarrow HCHC + H_2O_2$$

Das Schlüsselenzym für diese erste Abbaureaktion ist die in vielen methylotrophen Hefen nachgewiesene, durch Methanol induzierbare Alkoholoxidase. Neben Methanol werden auch Äthanol, n-Propanol, n-Butanol und Allylalkohol von Alkoholoxidase umgesetzt, wobei die Substrataffinität des Enzyms zu diesen Substanzen allerdings erheblich geringer ist.

Alkoholoxidase konnte bisher aus C.boidinii, Candida spec. N-16, H.polymorpha und Kloeckera spec. isoliert werden. Mit zwei Absorptionsspektren bei 375 nm und 460 nm, sowie einem Molekulargewicht von 600000 bis 670000 besitzt das Enzym in allen vier Organismen annähernd gleiche Eigenschaften. Es besteht aus acht identischen Untereinheiten und benötigt FAD als Cofaktor (Tani et al.1972 a, b, Fujii und Tonomura 1972, 1975, Sahm und Wagner 1973, Kato et al. 1976).

Das durch die oben beschriebene Reaktion entstehende, für Zellen allgemein toxische Wasserstoffperoxid wird in einem zusätzlichen Schritt mit Hilfe einer Katalase in H_2O und Sauerstoff zerlegt.

Die Katalase-Aktivität ist bei C.boidinii bei einem Wachstum auf Methanol um den Faktor 5 größer als bei einer Anzucht auf einem glukose- oder äthanolhaltigen Substrat (Roggenkamp et al. 1974).

Als Enzym mit Doppelfunktion ist die Katalase zusätzlich zu einer Oxidation von H-Donatoren wie z.B. Methanol, Äthanol oder Ameisensäure unter Verbrauch von H_2O_2 beteiligt. Methanol kann somit in methylotrophen Hefen auch direkt durch Katalase umgesetzt werden (Fujii und Tonomura 1972, Roggenkamp et al. 1974).

Der zweite wesentliche Schritt der Methanol-Dissimilation besteht in einer Oxidation des Formaldehyds zu Formiat. Hierfür zeigt sich in allen bisher untersuchten

methanolverwertenden Hefen eine NAD-gekoppelte und Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (FD) verantwortlich (Fujii und Tonomura 1972, Kato et al. 1972, Sahm und Wagner 1973, Kato et al 1974a).

Im Gegensatz zur Alkoholoxidase und Katalase, die in den Mikrobodies und den Peroxisomen lokalisiert sind, konnte FD aus dem Zytoplasma von C.boidinii isoliert werden (Fukui et al.1975). Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 80000 und besteht aus zwei identischen Untereinheiten (Schütte et al. 1976). Interessanterweise kann Formaldehyd auch durch Alkoholoxidase und sogar durch Katalase oxidiert werden. Formaldehyd liegt in wässrige Lösungen hydratisiert vor und besitzt in diesem Zustand alkoholähnliche Eigenschaften, die solche Reaktionen ermöglichen. Allerdings kommt in methylotrophen Hefen diesen Reaktionen offenbar keine physiologische Bedeutung zu (Sahm 1975, van Dijken et al. 1979, Kato et al. 1976).

Die Umsetzung des Formaldehyds mit Hilfe von FD nach folgender Gleichung resultiert in einer Bereitstellung von für die ATP-gewinnung notwendigen Reduktionsäquivalenten ($NADH_2$) (Sahm 1975, Fujii und Tonomura 1975, van Dijken et al.1975):

$$HCHO + GSH \longrightarrow HOCH_2\text{-}S\text{-}G$$

$$HOCH_2\text{-}S\text{-}G + NAD \xrightarrow{FD} HCO\text{-}SG + NADH_2$$

$$HCO\text{-}SG + H_2O \xrightarrow{Hydrolase} HCOOH + GSH$$

Die weitere Oxidation des Formiats zu CO_2 erfolgt, soweit bisher bekannt, in allen methanolverwertenden Mikroorganismen mittels einer NAD-abhängigen spezifischen Formiatsdehydrogenase (Fujii und Tonomura 1972, Sahm und Wagner 1973, Kato et al. 1974, Schütte et al.1976).

Formiatdehydrogenase konnte aus C.boidinii in reiner Form gewonnen werden und ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 74000.

Die Frage der Spezifität des Enzyms ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen von van Dijken und Mitarbeitern (1976) an Hansenula polymorpha, Pichia pinus, und C.boidinii zeigten, daß Formiatdehydrogenase eine 40-fach höhere Affinität zu S-Formylglutathion (s. letztere Gleichung) im Vergleich zu Formiat besitzt. Unter Zugrundelegung dieser Ergebnisse wurde folgender Reaktionsverlauf postuliert, der ebenfalls in einer Bereitstellung von $NADH_2$ für die Atmungskette resultiert:

$$HCO\text{-}SG + NAD + H_2O \longrightarrow CO_2 + NADH_2 + GSH$$

Legt man den jetzigen Stand der Forchung zugrunde, so läßt sich die Lokation und der Mechanismus der Methanol-Oxidation einer Hefezelle in einem Schema wie folgt zusammenfassen:

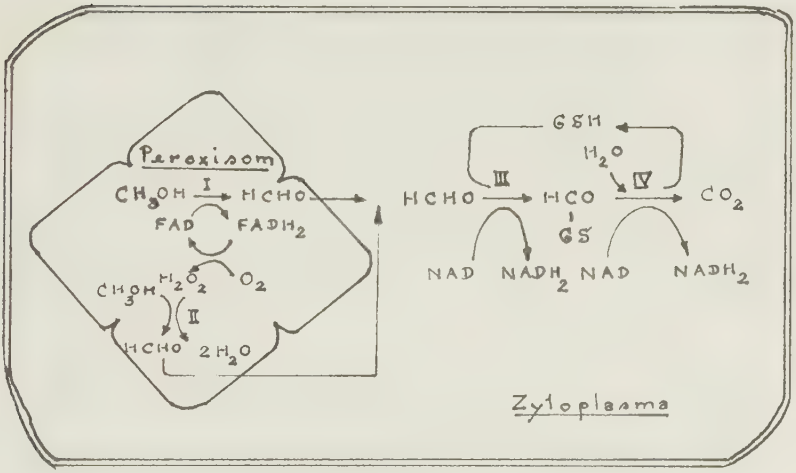


Abb. 5 : (nach Tani etal., 1978 und Sahm, 1977)
Darstellung Lokation und Mechanismen der Oxidation des Methanol in Hefen :

I. Alkoholoxidase
II. Katalase
III. Formaldehyddehydrogenase
IV. Formiatdehydrogenase

b.Methanol-Assimilation

Für die Synthese von Zellmaterial mit den C_1-Substraten Methanol sind bei methylotrophen Bakterien zwei verschiedene Stoffwechselwege nachgewiesen: Der Ribulosemonophosphatweg und der Serinweg.

> Im Ribulosemonophosphat-Zyklus wird das Zwischenprodukt Formaldehyd mit Ribulose-5-Phosphat über Fruktose-6-Phosphat in Triosephosphate als Grundbausteine für die weitere Synthese umgewandelt. Der entscheidende Schritt des Serin-Weges ist die Bildung von Serin aus Formaldehyd-Tetrahydrofolsäure und Glycin. Serin dient in der weiteren Reaktionsfolge zur Synthese von wichtigen Intermediärprodukten des Stoffwechsels wie Phosphopyruvat und Pyruvat (Quayle 1972).

Aufbauend auf den Kenntnissen über die bakterielle Methanol-Assimilation versuchte man eine Klärung des Methanol-Stoffwechsels in Hefe. Erste Einbauversuche von ^{14}C-Methanol bei Candida spec.N-16 führten zum Nachweis von Hexose- und Pentose-Phosphaten, insbesondere Fruktose-6-Phosphat, als Zwischenprodukte (Fujii und Tonomura 1973, Fujii et al. 1974).

Dieses Ergebnis wurde durch Analysen des Enzymspektrums zellfreier Systeme von C.boidinii, Kloeckera spec.2201 und Candida spec.N-16 unterstützt. Es gelang der Nachweis einer Hexulosephosphatsynthase, das Schlüsselenzym für den Ribulosemonophosphat-Zyklus, während Hydroxypyruvat-Reduktase (Schlüsselenzym des Serinweges) nicht gefunden werden konnte.

Die Hexulosephosphat-Synthase Konzentration war allerdings im Vergleich zum Bakterien-System um die Hälfte geringer und das Hefeenzym zeigte im Gegensatz zum Bakterienenzym eine sehr stark ATP-abhängige Aktivität (Diel et al.1974, Fujii und Tonomura 1974). Trotz dieser Unterschiede postulierte man für Hefe einen Ribulosemonophosphat-Zyklus analog zu Bakterien.

Neue Untersuchungen von van Dijken et al. (1978) führten zu einer Revision dieser Hypothese. Die Analyse zellfreier Extrakte von H.polymorpha und C.boidinii führte zur Entdeckung des Dihydroxyaceton-Stoffwechselweges. In methylotrophen Hefen wird Formaldehyd zunächst durch die methanolspezifische Transketolase Dihydroxyaceton-(DHA) Synthase in Gegenwart des Ketoldonors Xylulose-5-Phosphat

fixiert und es entstehen als Zwischenprodukt Dihydroxyaceton (DHA) und Glyceraldehyd-3-Phosphat.

DHA-Synthase konnte aus drei methylotrophen Hefen in reiner Form gewonnen und analysiert werden. Das Enzym weist in C.boidinii Kb 1 und C.boidinii CBS 5777 mit 145000 und 107500 abweichende Molekulargewichte auf und besteht aus jeweils zwei Untereinheiten. In Kloeckera spec. 2201 handelt es sich um ein Tetramer mit einem Molekulargewicht von 190000. Die Ursachen dieser Unterschiede sind bisher nicht geklärt (Bystrykh et al.1981, Kato et al. 1982, Waites und Quayle 1983). Als Kofaktoren sind Thiaminpyrophosphat und Mg^{2+}-Ionen erforderlich.

Soweit bekannt, wird DHA im weiteren Vorgang durch eine methanolinduzierte ATP-abhängige Triokinase phosphoryliert mit Hilfe von Fruktose-1,6-diphosphatase in Fruktose-1,6-diphosphat überführt und in dieser Form in den zentralen Zellstoffwechsel eingeschleust (O'Conner und Quayle 1979, 1980, Waites und Quayle 1980,1981).

D. Problemstellung

"Single Cell Protein" (SCP) oder Einzellerprotein finden als Zusatz zu menschlichen Nahrungs- und tierischen Futtermitteln Verwendung. Hefen weisen als Organismen für die SCP Produktion gegenüber anderen Mikroorganismen wie z.B. Bakterien einige wichtige Vorteile auf, wie etwa ihre Größe (sie ermöglicht eine leichte Abtrennung der Zellen vom Medium) oder einen geringeren Nukleinsäuregehalt (vermindert die Gefahr gewisser Erkrankungen). Daneben sind Hefen für genetische Untersuchungen aus verschiedenen Gründen (z.B. Möglichkeit zur Tetradenanalyse) besonders gut geeignet.

Als Substrat für die Anzucht bietet sich Methanol an, das aus verschiedensten Rohstoffen (z.B. Kohle, Holz) gewonnen werden kann.

Eine wirtschaftliche Produktion von SCP auf Methanolbasis ist insbesondere von der Fähigkeit des verwendeten Mikroorganismus zur Verwertung des Substrates bedingt. Sie kann durch verschiedene genetische Maßnahmen wie Mutation und Selektion oder durch sexuelle oder parasexuelle Rekombinationsvorgänge verbessert werden. Eine Stammverbesserung durch sexuelle Rekombinationsvorgänge ist dabei einer solchen mittels parasexuelle Vorgänge vorzuziehen, da erstere mit höherer Frequenz auftreten.

Da Kreuzungsexperimente jedoch bei selbstfertilen Arten, wie es auch die in dieser Arbeit verwendeten Hefearten Pichia pinus und Pichia lindnerii sp.n.Wolf und Wind. (1975) sind, nicht ohne genaue Kenntnis des Entwicklungszyklus und des Fortpflanzungsverhaltens möglich ist, sollen im ersten Teil der Arbeit die Entwicklungszyklen der verwendeten Hefestämme aufgeklärt werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollen molekularbiologische Kriterien (Schwimmdichte, Restriktionsmuster) für eine Artabgrenzung der verwendeten Hefestämme ausgetestet werden. Eine sichere Artabgrenzung ist dabei für eine richtige Einschätzung von Kreuzungsergebnissen zwischen verschiedenen Stämmen einer- bzw. verschiedenen Arten wichtig.

Schließlich sollte abschließend versucht werden die selbstfertilen Hefestämme zu kreuzen, um die Zahl der

an der Regulation des Methanolstoffwechsels beteiligten Gene zu ermitteln, sowie um bei ihnen eine Rekombination des genetischen Materials als Voraussetzung für zukünftige gezielte Züchtungsarbeiten nachzuweisen.

Praktischer Teil

II. Material und Methoden

A. Stämme

P.lindnerii sp.n.Wolf und Wind. 1975: Stamm DSM 70722 (Deutsche Stammsammlung, Göttingen)

P.pinus (Holst) Phaff 1956: Stamm DSM 70384 (Deutsche Stammsammlung, Göttingen)

P.pinus (Holst) Phaff 1956: Stamm $MH_4$36 und $MH_4$21 (S.V. Benevolensky, Moskow)

Morphologie auf YE-Medium bei 25°C, 7d	P.lindnerii	P.pinus DSM	P.pinus MH_4
1. Makromorphologie			
Koloniefarbe	weiß, hellbraun	weiß, hellbraun	weiß, hellbraun
Kolonieform	rund, flach	rund, gewölbt	rund, gewölbt
Kolonieoberfläche	glänzend oder matt, glatt	glänzend oder matt, glatt	glänzend oder matt, glatt
2. Mikromorphologie			
vegetative-Zellen	oval-rund	oval-rund	oval-rund
Sprossungstyp	meist polar selten multilateral	multilateral	meist polar, selten multilateral
Asci	rund	rund	rund
Ascosporen	2-4, hutförmig	2-4, hutförmig	2-4, hutförmig

Tab.7: Übersicht der verwendeten Hefestämme

B. Medien und Kulturbedingungen

Die Stämme wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 25°C in YE-Medium angezogen.

Medien

a) Voll-Medium (YE): 0,5 % Hefeextrakt, 2 % Glucose, 2 % Agar

b) Minimal-Medium (MM): 1 % Glucose, 2 % Agar, 20 µg/L Biotin 100 ml MM 1, 10 ml MM 2 auffüllen auf 1 L, pH 5,8-6,0

MM 1	g/L	MM 2	mg/L
KH_2PO_4	10,0	H_3BO_3	50,0
$MgSo_4 \cdot 7H_2O$	5,0	$CuSo_4 \cdot 5H_2O$	4,0
NaCl	1,0	KJ	10,0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,0	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	20,o
$(NH_4)SO_4$	50,0	$MnSO_4 \cdot h_2O$	40,0
		$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	18,0
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	40,0

c. Als Medien zur Bestimmung der Kohlenstoffassimilation bzw. der Kohlenstoffermentation sowie der Stickstoffassimilation wurden solche nach Lodder (1970) verwendet. Es handelt sich dabei um YNB (Yeast-Nitrogen-Base) bzw. YCB (Yeast-Carbon-Base) von Difco.

d. Medium zur Bestimmung der Hydrolyse von Harnstoff (Christensen 1946).

e. Medium zur Methanolverwertung

			Spurenelemente	mg/L
1)	Methanol	7,5 g	EDTA	35
	Hefeextrakt	1,0 g	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	20
	$(NH_4)HPO_4$	5,0 g	$MnSO_4$	20
	$NaNO_3$	0,2 g	$CuSO_4$	10
	EDTA	0,28 g	$CaSO_4$	10
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g	$Co(NO_3)_2$	10
	KCl	0,1 g	$ZnSO_4$	10
	Spurenelement	10,0 ml		
	Biotin	20,0 ug/L		

auf 1 L mit dest. Wasser auffüllen. Der pH-Wert werde nach Zugabe von $NaNO_3$ auf 6,8 eingestellt.

2) MM, in dem Glucose durch 5 % (v/v) Methanol ersetzt wurde. f. Medien für Kreuzungsversuche

ME (Malzextrakt-Medium): 1 % Malzextrakt, 2 % Agar

RG (Restrict-Growth-Medium, Herman 1971): 0,02 % Hefeextrakt, 0,02 % Bactopepton, 0,1 % Glucose, 2 % Agar

FG (Fowell-Medium,Fowell 1952): 0,4 % CH_3COONa, 2 % Agar

PS (Prä-Sporulationsmedium): 2 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 % KH_2PO_4, 2 % Agar

YM (Hefeextrakt-Malzextrakt-Medium, Wickerham 1951): 0,3 % Hefeextrakt, 0,3 % Malzextrakt, 0,5 % Pepton, 2 % Agar.

C. Physiologische und morphologische Charakterisierung von Hefe

a. Die Fermentation und Assimilation von Kohlenstoff sowie die Assimilation von Stickstoff wurden nach den Standardmethoden von Lodder (1970) durchgeführt.

b. Bestimmung der linearen Wachstumsrate bei verschiedenen Temperaturen: Sowohl Einsporkulturen als auch Einzellkulturen von P.pinus (DSM 70384) und P.lindnerii (DSM 70722) wurden punktförmig mit der Impfnadel auf YE-Platten geimpft. Inkubation der Kulturen erfolgte bei 15°C, 18°C, 25°C bzw. 35°C. Nach 40 d wurde der Durchmesser der Kolonien (Drehelipsoid) bestimmt.

c. Bestimmung des Zellvolumens:
Die Bestimmung des Zellvolumens erfolgte mikroskopisch nach ca. 18 stündiger Inkubation der Stämme in YE-Flüssigmedium (25°C, Rotationsschüttler) mit Hilfe eines Okularmikrometers.

d. Bestimmung des Ploidiegrades: (nach Yamazaki und Oshima 1979 a,b; Wolf et al. 1979).
Einspor- bzw. Einzellkulturen wurden auf YE-Medium, dem 15 µg/ml Trypanblau (Sigma, USA) und 10 µg/ml Phloxin-B (Serva, Heidelberg) zugesetzt wurde (sterilfiltriert), bei 25°C, 30°C, und 35°C bzw. bei 25°C oder 30°C auf RG-Medium angezogen und innerhalb von zwei Wochen ausgewertet. Innerhalb dieser Zeit färbten sich homozygot-diploide Zellen dunkel violett und haploide schwach violett.

D. Cytologische Methoden

a. Färbung der vegetativen Kerne mit Auramin-O (nach Lemke et al. 1975) (keine Veränderung)

- Übertragen von Hefezellen auf einen Objektträger mit anschließender Lufttrocknung.
- Hydrolyse des Präparates über 2 min. bei 60°C in 1 N-HCl
- Abkühlung des Objektes im Eisbad
- Färbung über 20 min. mit Auramin-O (0,1 g Auramin-O (Chroma-Gesellschaft, Stuttgart), 20 ml Aqua dest., 0,2 g Kaliumsulfit, 2 ml 1 N-HCl (Titrisol, Merck, Darmstadt))
- Waschen der Präparate in Wasser bis keine Gelbfärbung mehr frei wird.

- Zweimaliges Waschen in 45 % Essigsäure und anschließend Lufttrocknen des Präparates.
- Eintauchen des Objektes in 95 % Äthanol und sofort erneut trocknen.
- Zugabe eines Tropfens Saccharose und eindeckeln des Präparates
- Mikroskopie im UV-Licht

b. Giemsa-Kernfärbung (nach Sukroongreung und Miranda 1973, verändert):

Sporulierende Hefekulturen (luftgetrocknet) wurden folgendermaßen gefärbt:

- Fixierung der Hefezellen (auf einem Objektträger) in Äthanol-Eisessig (1:1).
- 5 min. waschen in dest. Wasser und anschließend absaugen des Wassers.
- Fixierung des Objekts für 10 min. in Helly-Lösung (5% w/v $HgCl_2$, 3 % w/v $K_2Cr_2O_7$ und 6 % Formaldehyd; Formaldehyd erst kurz vorher zugesetzt).
- Waschen in Leitungswasser bis keine Gelbfärbung mehr frei wird
- Hydrolyse über 10 min. in 1 N-HCl bei 60°C.
- dreimal mit dest. Wasser waschen
- Präparat 1h in Phosphatpuffer, pH 7,0 eintauchen
- Färbung des Objektes über 3h in einer mit Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt) 2,5 ml Giemsa Stammlösung in 50 ml über ca. 1h gekochtem und mit Stickstoff durchblasenem (5 min.) Phosphatpuffer, pH 7,0) gefüllten und mit Parafilm luftdicht verschlossenen Färbeküvette in einem Eisbad.
- Entfärbung in Wasser über 30 sec. bis zu 1 min.
- Eindeckeln des Präparates.

c. Feulgen-Karminessigsäure Kernfärbung:

Frisch sporulierende Hefekolonien wurden nach Übertragung in eine auf einem Objektträger ausgestrichenen Albuminschicht nach der Methode von Storck und Black (1970) sowie Petersen et al. (1978) folgendermaßen gefärbt:

- Fixierung der luftgetrockneten Zellen in absolutem Äthanol-Eisessig (1:1) über 30 min.
- Waschen in entionisiertem Wasser (5 min.)

- Eintauchen des Objektes für 1 min in 1 N-HCl (25°C)
- Hydrolyse in 1 N-HCl (60°C) für 10 min.
- Färbung im Dunklen für 2h in Feulgen-Schiff-Lösung (1 g basisches Fuchsin (Serva, Heidelberg), 1,8 g Kaliummetabisulfit, 1 g Aktivkohle)
- Entfärbung für 30 sec. in dest. Wasser.
- Färbung mit Karminessigsäure (ca. 1-5 min.)

Nach dem Eindeckeln des Präparates erfolgte die Mikroskopie im Phasenkontrastmikroskop.

. Biochemische Methode zur Bestimmung des DNA-Gehaltes

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde die folgende biochemische Methode (nach Burton 1956 und Richards 1974, verändert) angewandt.

1. Extraktion der DNA (nach Stewart, 1975)

- Ca. $3x10^9$ Zellen einer über 24 h angezogenen Einsporbzw. Einzellkultur in 2,5 ml Wasser aufnehmen und in der Tischzentrifuge (3 min., 2350 g) abzentrifugieren.
- Aufnehmen des Zellpellets in 2,5 ml 1 N $HClO_4$ und erneute Zentrifugation.
- Erneute Aufnahme des Zellpellets in 2,5 ml 1 N $HClO_4$ und Inkubation über 20 min. bei 70°C im Schüttelbad, wobei die DNA der Hefezellen extrahiert wird.
- Zentrifugation
- Aufnahme des Überstandes, der aufbewahrt wird.
- Erneute Extraktion der DNA mit 1 N $HClO_4$ (wie oben).

. Bestimmung des DNA-Gehaltes

- Der DNA Gehalt im Überstand (nach Stewart 1975, ca. 95-99 % der Gesamt-DNA der Hefezellen) wurde mit Diphenylamin-Lösung (3 g Diphenylamin (Serva, Heidelberg) in 100 ml Eisessig, 1,5 ml konz. Schwefelsäure und 100 µl einer kurz vor dem Gebrauch hergestellten Acetaldehydlösung (16 mg/ml) folgendermaßen bestimmt:
- 2,5 ml des Überstandes mit der extrahierten DNA wurden 2,5 ml Diphenylaminlösung zugesetzt und 24 h bei 20- 25°C im Dunklen inkubiert.

Während dieser Zeit reagiert die Deoxyribose der DNA mit der Diphenylaminlösung, wobei die Lösung sich blau färbt. Die Farbintensität wurde bei 600 nm im Photometer (Spectronic 20 Bausch und Lomb) als Extinktion gemessen, die

ein Maß für den DNA-Gehalt einer Lösung darstellt. Der DNA-Gehalt wurde durch Vergleich mit einer Standardeichkurve bestimmt, wobei Kalbs-Thymus DNA-Lösungen bekannter Konzentrationen als Standard dienten.

F. Genetische Methoden

a. Sporisolation

Einsporkulturen wurden nach Johnston und Mortimer (1959) hergestellt:

- Inkubation von sporulierenden Hefezellen in 0,1 ml Trichodermaenzymlösung (1 mg eines selbsthergestellten Lyophylisates (siehe Abschnitt Protoplastenherstellung) in 1 ml 0,05 M Tris-HCl, 1,4 M Sorbit, pH 7,5) über 40-60 min im Wasserbad bei 30°C.
- Übertragung eines Teiles der Zellsuspension auf ein mit YE-Agar beschichtetes Deckgläschen.
- Isolation der Sporen einer Tetrade mit Hilfe eines Mikromanipulators (Leitz).
- Inkubation der Sporen über ca. 48 h bei 25°C.
- Übertragung von Zellen der nach dieser Zeit gewachsenen Kolonien auf YE Agarplatten

b. Isolierung von Varianten

- Anzucht der Stämme P.pinus (DSM 70384) und P.lindnerii (DSM 70722) in Flüssigvollmedium über Nacht bei 25°C.
- Zentrifugation von 3 ml der Zellsuspension in der Tischzentrifuge (3 min., 2350 g).
- Zweimaliges Waschen der Zellen in je 5 ml Ringerlösung und anschließend erneute Zentrifugation.
- Bestrahlung von 10 ml einer Zellsuspension der Konzentration von ca. 1-2 X 10^7 Zellen/ml, bei leichter Bewegung über 3 min. (P.pinus) bzw. 2 min. 30 sec. (P. lindnerii) mit UV-Licht (254 nm, Energiedichte 1800 erg/mm^2).
- Ausplattieren von 0,2-0,3 ml einer Zellverdünnung mit einer Zellkonzentration, bei der nach zwei Tagen Bebrütung bei 25°C in Dunkelheit ca. 150-300 Kolonien pro Platte zu erwarten waren, auf YE-Agarplatten.
- Überstempeln der Kolonien nach 2 Tagen Inkubation mit Hilfe eines Samtstempels nach der Lederberg Replikatechnik (Lederberg und Lederberg, 1952) auf MM-Medium und Inkubation über 2 Tage.

- Überimpfen von Kolonien auf YE- und MM-Medium, die auf MM kein Wachstum zeigte.
- Kolonien, die auch nach Inkubation über ca. 7 Tage kein Wachstum zeigten, wurden von YE-Medium als auxotrophe Varianten isoliert.

c. Auxotrophie-Test

In steriler Ringerlösung (Zelldichte ca. 1-3 X 10^8 Zellen/ml) suspendierte Zellen von isolierten Varianten wurden auf je ein Feld einer in 8 Felder unterteilten MM-Platte geimpft. Auf jedes dieser Felder wurden einige Kristalle einer der folgenden Substanzen aufgesetzt:

1) Aminosäuren:
L-Alanin, L-Asparaginsäure, DL-Cystein, DL-Glutamin, L-Histidin, L-Lysin, L-Leucin, DL-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Isoleucin, DL-Valin.

2) Purinbasen: Adenin, Guanin, Hypoxanthin.

3) Pyrimidinbasen: Cytosin, Uracil, Thymin.

4) Vitamine: Nicotinsäure, Pantothensäure, Para-Aminobenzosäure, Riboflavin, Thiamin, Pyridoxin, Inositol, Folicacid.

Nach ca. 2 d Inkubation bei 25°C im Dunklen konnte festgestellt werden, ob die isolierte Auxotrophie-Variante für eine der getesteten Substanzen auxotroph war. In diesem Falle war in dem entsprechenden Sektor eine Kolonie entstanden.

d. Kreuzung zweier Varianten

(1) durch Mischen von Zellen (Minimal-Plate-Mating-Technique nach Pomper und Burkholder 1949).

Anzucht auxotropher Varianten über 16-20 h in YE-Flüssigmedium bei 25°C auf dem Rotationsschüttler. Überimpfen von jeweils 0,5 ml der beiden Varianten in 10 ml PSM und Inkubation über Nacht bei 25°C auf dem Rotationsschüttler. Zentrifugation von 5 ml der so angezogenen Zellen, Aufnahme des Zellpellets in 10 ml YM und Inkubation über 5 d bei 25°C. Zentrifugation von 3 ml der Mischkultur und zweimaliges Waschen mit Ringerlösung. Ausplattieren von ca. 5 X 10^7 Zellen in Ringerlösung auf MM, Inkubation bei 25°C über 2 Wochen.

2) durch Protoplastenfusion

1) Herstellung von Trichodermaenzym:

Die Herstellung des Trichodermaenzyms erfolgte nach der Methode von Isaac und Peberdy 1979. Als Inkubationssubstrat dienten anstelle von Chitin und Laminaria-Puder die aufgeschlossenen Zellwände von Saccharomycopsis lipolytica (250 g Feuchtgewicht/100 L) und Pichia pinus (DSM 70384) 1000g/100 L.

2) Protoplastenherstellung:

Inkubation sowohl der prototrophen Ausgangsstämme als auch der isolierten Mutanten über 16 bis 20 h in YE-Flüssigmedium bei 25°C. Dreimaliges Waschen von je 3 ml dieser Kulturen (logarithmische Wachstumsphase) mit je 5 ml Tris-HCl-Puffer (0,05 M Tris, pH 7,5) und Zentrifugation der Zellen. Inkubation der Hefezellen über 30 min in 0,3 g Natriumthioglykolat (in 5 ml Tris-HCl Puffer) bei 30°C in Schüttelwasserbad, Zentrifugation der Zellsuspension über 15 min. bei 2350 g. Aufnahme der Zellen in:

a. 2 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,4 M Sorbit und 2 mg Trichodermaenzym sowie 0,5 mg Sulfatase (Sigma) bzw.

b. 2 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,4 M Sorbit und 2 mg Trichodermaenzym bzw.

c. 2 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,4 M Sorbit und 2 mg Trichodermaenzym sowie 0,1 ml Arylsulfatase (Boehringer, Mannheim) 5 mg/3 ml Puffer

d. 5 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,4 M Sorbit und 3 mg Zymolyase 5000 (Kirin Brewery, Japan) bzw.

e. 5 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,4 M Sorbit und 0,6 mg Zymolyase 60,000 (Kirin Brewery, Japan).

Inkubation des Ansatzes im Schüttelwasserbad bei 30°C. Mikroskopische Kontrolle des Ansatzes nach jeweils 15 min. Inkubation, bis 70-95 % Protoplasten im Ansatz enthalten waren. Zentrifugation der Protoplasten und Aufnahme in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,4 M Sorbit. Erneute Zentrifugation und dreimaliges Waschen der Protoplasten im gleichen Puffer. Verdünnung der Protoplastensuspension mit Puffer (wie oben) auf eine Konzentration von ca. 1-2 X 10^8 Protoplasten/ml. Bestimmung der Protoplastenregenerationsrate durch Ausplattieren von Verdünnungen der Protoplastensuspensionen auf mit Sorbit stabilisiertem YE-

Medium. Kontrolle: Animpfen von YE-Platten mit einer mit Wasser verdünnten Protoplastensuspension und Ausplattieren von Protoplasten (ca. 3 X 10^7 Protoplasten/Platte) der verwendeten Varianten auf stabilisiertes MM zur Bestimmung der Reversionsraten.

3) Protoplastenfusion:

Protoplastenfusion mit PEG (nach Ferenczy et al. 1976, verändert).

Mischen von je 1 ml Protoplastensuspension zweier Varianten (1-2 X 10^8 Protoplasten/ml) und Zentrifugation (5 min, 1500 g). Aufnahme des Pellets in 1 ml einer vorgewärmten (30°C) PEG-Lösung (Konzentration: 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, bzw. 50 % PEG-6000) in 10 mM $CaCl_2$, pH 7,5. Inkubation der Protoplasten für 15-30 min bei 30°C. Verdünnung der Protoplastensuspension mit 5 ml Puffer (wie oben) und Zentrifugation über 5 min. bei 1500 g. Erneute Aufnahme des Protoplastenpellets in 5 ml Tris-HCl, Sorbit-Puffer und Zentrifugation. Nach Aufnahme des Sediments in 2 ml Tris-HCl, Sorbit-Puffer ausplattieren von 0,2 ml der Suspension auf stabilisiertes MM-Medium (MM + 1,4 M Sorbit, pH 5,8-6,0).

Elektrofusion:

Als alternative Methode zur Fusion von Protoplasten wurde die Elektrofusion nach Zimmermann und Scheurich (1981) angewendet. Je 1 ml (ca. 1-5 X 10^7) Protoplastensuspension (in 1,4 M Sorbit, pH 7,5) zweier auxotropher Stämme wurden gemischt, wobei die Fusion der Protoplasten (50 µl) erfolgt in einer Fusionskammer (Zimmermann und Scheurich 1981) nach Kettenbildung der Protoplasten (im Wechselfeld bei 5 V, 2 MHz) bei 40 µs Pulsen von 40-45 V bzw. 80-90 V Gleichstrom im Abstand von 10 sec. und Elektrodenabstand 40-50 µm bzw. 100 µm.

f. DNA-Isolation

DNA-Isolation erfolgte nach Methode von Cryer et al. 1975 (verändert). Zur Reinigung und Anreicherung mitochondrialer DNA fand Hydroxylapatit Chromatographie (Colman et al. 1978) Anwendung.

g. DNA-Charakterisierung

1) Analytische Ultrazentrifugation:

Die Schwimmdichtebestimmungen wurden in der analytischen

Ultrazentrifuge (Beckman Model E) durchgeführt. Als Marker wurde DNA von Micrococcus lysodeikticus (ρ =1,731 g/cm^3 und Clostridium perfringens (ρ =1,6915 g/cm^3) verwendet. Die Berechnung erfolgte nach Szybaski (1968). Die Bestimmung des GC-Gehaltes erfolgte nach der Gleichung

$$GC\ \% = \frac{\rho - 1{,}66}{0{,}098} \times 100$$

nach Schildkraut et al. 1962.

2) Restriktionsanalyse:

Einsatz von Restrik tionsendonukleasen in Einfach-und Doppelverdauungen: In dieser Arbeit wurden die Restriktionsendonukleasen Bgl II, Cla I, EcoR I, Hind III, Hpa II, und Pst I (Boehringer, Mannheim) und Hae III (Bethesda Research Lab. Inc.) verwendet. In Doppelverdauungen fand der Inkubationspuffer der beiden Restriktionsenzyme Anwendung, welcher die geringere Ionenstärke besaß. Nach ca. 6-stündiger Inkubation bei 37^{o}C wurden die Reaktionen mit 0,025 %iger Bromphenolblaulösung in 60 % Saccharose /20 mM EDTA gestoppt.

3) Gelelektrophorese:

Die Fraktionierung der Restriktionsfragmente erfolgte in einer Horizontalapparatur (modifiziert nach McDonell et al. 1977) Verwendete Gele: 0,6 % und 1.0 %ige Agarose-Gele (Seakem) in Tris-Acetat-Puffer (Palmer et al. 1979). Anfärbung der Gele: 1 mg Ethidiumbromid/Liter Elektrophoresepuffer. Als Größenstandard fungierte λ DNA restringiert mit Hind III.

III. Ergebnisse

A. Charakterisierung der verwendeten Hefestämme:

1. Physiologie:

Zur sicheren Unterscheidung der verwendeten Hefearten und zur Überprüfung der Artbestimmung wurden physiologische Tests auf verschiedenen Medien durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 8 zusammengefaßt. Alle vier getesteten Hefestämme sind nicht in der Lage, die verwendeten C-Quellen zu fermentieren. P.lindnerii und P.pinus lassen sich auf Grund ihres unterschiedlichen Kohlenstoff- (L-Arabinose, Bernsteinsäure, Citronensäure, Erythritol) und Stickstoffassimilationsverhaltens (Harnstoff) physiologisch gut voneinander unterscheiden. Die Stämme DSM und MH_4 von P.pinus dagegen zeigen bei der Stickstoffassimilation und bei der Kohlenstoffassimilation bis auf die Assimilationsfähigkeit von Rhamnose identische physiologische Merkmale auf. Diese Ergebnisse stimmen mit für die entsprechenden Arten in der Literatur beschriebenen Daten überein.

physiologischer Test	P.pinus DSM 70384	P.lindnerii DSM 70722	P.pinus MH_4 21	P.pinus MH_4 36
C-Fermentation:				
Cellobiose	-	-	-	-
Galaktose	-	-	-	-
Glukose	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-
C-Assimilation:				
Äthanol	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-
L-Arabinose	+	-	+	+
Bernsteinsäure	+	-	+	+
Cellobiose	+	+	+	+
Citronensäure	-	+	-	-
Erythritol	+	-	+	+
Galaktitol	-	-	-	-
Galaktose	-	-	-	-
Glukose	+	+	+	+
Glycerin	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-

physiologischer Test	P.pinus DSM 70384	P.lindneriі DSM 70722	P.pinus [illegible] 21	P.pinus [illegible]
Inulin	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
-Methylglucosid	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+
D-Ribose	+	-	+	+
L-Rhamnose	+	+	-	-
Saccharose	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+
N-Assimilation:				
Äthylamin-HCl	+	+	+	+
Harnstoff	+	-	+	+
$(NH_4)_2SO_4$	+	+	+	+
Pepton	+	+	+	+
NO_2	-	-	-	-
NO_3	-	-	-	-

Tab. 8: Physiologische Beschreibung der verwendeten Hefestämme. + = Fähigkeit zur Fermentation bzw. Assimilation, - = Fehlen dieser Fähigkeit

2. Ermittlung der optimalen Wachstums- und Sporulationsbedingungen:

Zur Ermittlung der optimalen Wachstums- und Sporulationsbedingungen wurden die verwendeten Hefestämme zunächst auf verschiedenen Medien(YE, MM, und [illegible]) bei konstanter Temperatur (25°C) angezogen. Makroskopische (sporulierende Kolonien zeigen leicht bräunliche Farbe, während nicht sporulierende Kolonien weiß sind) und mikroskopische Beobachtungen ergaben, daß die Stämme am besten auf YE-Medium, aber auch auf MM-Medium sporulierten.

Die Ermittlung der optimalen Waschtumstemperatur erfolgte auf YE-Medium bei 15°, 18°, 25° und 35°C. Dabei wurde der Koloniedurchmesser von 8-15 Kolonien, die bei identischer Temperatur angezogen wurden, nach 40 d Inkubation gemessen und die entsprechenden Durchschnittswerte stellten ein Maß für das Wachstum dar.Wie in Tab.9 dargestellt, zeigten die einzelnen Hefestämme ihr optimales Wachstum bei 25°C auf YE-Medium. Unter diesen Bedingungen

waren sie außerdem in der Lage zu sporulieren.

T(°C)	P.lindnerii DSM 70722			P.pinus DSM 70384		
	SØ (mm)	WØ (mm)	RØ (mm)	SØ (mm)	WØ (mm)	RØ (mm)
15	15.1∓0.7	14.4∓0.5	13.6∓1.2	12.9∓0.9	12.5∓0.6	13.1∓1.0
18	15.4∓0.4	14.5∓0.4	14.3∓0.9	14.0∓0.7	13.0∓0.6	13.5∓0.5
25	17.4∓0.6	15.0∓0.7	14.9∓1.5	16.1∓0.6	14.8∓0.9	16.1∓0.8
35	11.1∓0.7	11.5∓1.1	11.2∓2.0	9.2∓1.1	8.0∓0.7	8.2∓0.7

Tab. 9: Vergleich des linearen Wachstums der Hefekolonien bei verschiedenen Temperaturen. S= Einsporkultur (Ascosporen), W= Einzellkultur von weißen nicht sporulierenden Zellen, R= Einzellkultur (von einer sporulierenden Kolonie), Ø= Koloniedurchmesser (mm), T= Temperatur (°C).

3.Bestimmung der Kernzahl:

Für die Durchführung verschiedener genetischer Experimente wie etwa die Herstellung von Varianten oder die richtige Einschätzung von Kreuzungsexperimenten ist es wichtig, die Kernzahl der entsprechenden Organismen zu kennen. Aus diesem Grunde wurden für die verwendeten Pichia-Arten Kernfärbung durchgeführt. Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Auramin-O ergab für beide Pichia-Arten stets Einkernigkeit der vegetativen Zellen (Abb. 6).

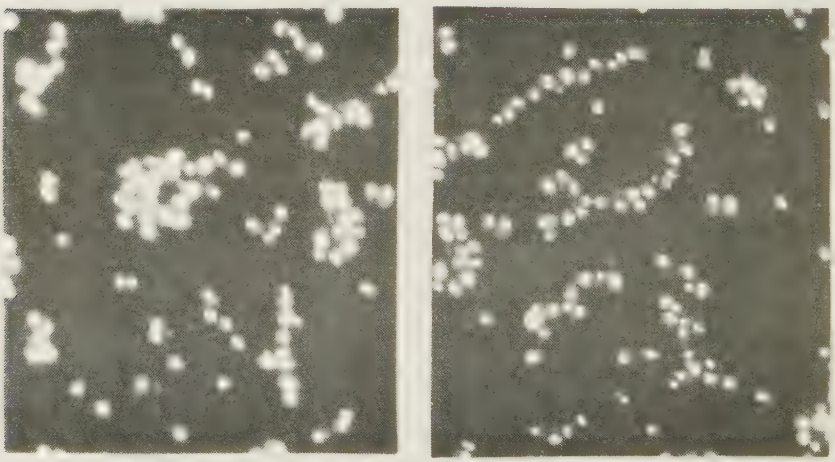


Abb. 6: Mikroskopische Aufnahmen vegetativer Zellen von P.pinus (a) und P.lindnerii (b) nach Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Auramin-O. Die fluoreszierenden Strukturen im Inneren der Zellen stellen die Zellkerne dar.

B. Aufklärung der Ontogenese

Die Hefen der Gattung Pichia gehören zu den perfekten Hefen, d.h. sie weisen einen Sexualzyklus auf. Im Verlaufe ihres Entwicklungszyklus bilden sie Asci und Ascosporen. Ob die Ascosporen dabei Meio- oder Mitosporen sind, darüber liegen zur Zeit keine zytologischen Daten vor. In einer sporulierenden Kultur von Pichia kommen außerdem neben Asci mit Ascosporen ständig große, einzeln liegende ovale Zellen sowie kleine, fast runde Zellen (immer mit einem oder zwei Sprossen) vor. Diese Beobachtung führte zu der Überlegung, daß die unterschiedlichen Zellen in einer Pichia Kultur verschiedene Stadien im Entwicklungszyklus dieser Hefen sein könnten. Weiter stellt sich die Frage nach dem Kernphasenwechsel und damit nach dem Ploidiegrad der verschiedenen Zellen. Die ovalen Zellen sind dabei auf Grund ihrer Größe verdächtig, diploid zu sein, während die kleinen rundlichen Zellen haploid sein könnten. Die Reduktion des Plodiegrades von diploid zu haploid könnte dann durch eine Meiose oder aber durch mitotische Haploidisierung erfolgen.

Um diese Vermutungen zu überprüfen, sollte für P.pinus und P.lindnerii versucht werden, die Meiose als mögliche Ursache für die Reduktion des Ploidiegrades durch Zellvolumen-, DNA-Gehaltsbestimmung und auch durch einen spezifischen Farbtest der einzelnen Zellen einer Pichia Kultur zu bestimmen.

1. Nachweis des Kernphasenwechsels:

a) Zytologischer Nachweis von Meiose und Mitose:

aa. Meiose:

Mit Hilfe der Feulgen-Karminessigsäure-Kernfärbung konnten in frisch sporulierenden Kulturen von Pichia pinus und Pichia lindnerii sämtliche Stadien der Sporenentwicklung aufgefunden werden. Der Interphase Kern von P.pinus (Abb. 7 a) bzw. P.lindnerii (Abb. 8 a) ist einheitlich dunkel gefärbt. Die verschiedenen Stadien der Prophase I (Abb. 7 b, Abb. 8 b) konnten nicht von einander unterschieden werden, was auf die besonders kleinen Chromosomen dieser Organismen zurückzuführen ist (die Größe der Chromosomen liegt an der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops). In der Metaphase I (Abb. 7 c-e und Abb. 8 c links)

ordnen sich die Bivalente (3-4) in der Äquatorialebene. Anschließend trennen sich die Chromosomenpaare jedes Bivalents in der Anaphase I und gelangen zu den entgegengesetzten Polen der Zelle (Abb. 7 f-h und Abb. 8 d, e). Dieser Trennungsvorgang ist in der Telophase I (Abb. 7 i-k, Abb. 8 f) beendet, sodaß zwei Tochterkerne entstehen. In der Prophase II beginnen die Chromosomen wieder mit der Spiralisierung (Abb. 7 l, Abb. 8 g); in der Metaphase II sind sie stark verkürzt (Abb. 7 m, n= 3-4). In der Anaphase II trennen sich die Schwesterchromatiden voneinander (Abb. 7 n-p, Abb. 8 h-i) und es bilden sich nach der Beendigung des Trennungsvorganges in Telophase II vier Kerne (Abb. 7 1-s, Abb. 8 j). Jeder der Kerne wird sofort in eine Spore eingeschlossen (Abb. 7 t, Abb. 8 k,l). Damit sind viersporige Asci entstanden, die vier Meiosporen enthalten. Die Meiose, die hier stattfindet,ist bei den beiden Pichia Arten weitgehend mit der bei anderen höheren Organismen zu vergleichen. Neben den typischen viersporigen Asci kommen jedoch bei Pichia zwei- und dreisporige Asci vor. Diese erschweren die genetischen Analysen erheblich, da über die Kernverhältnisse in deren Ascosporen generell nichts bekannt ist. Aus diesem Grunde sollte versucht werden, durch Kernfärbungen der generativen Hefezellen die Entstehung von zwei- und dreisporigen Asci sowie die Kernverhältnisse in deren Ascosporen aufzuklären. Giemsa-Kernfärbungen generativer Pichia lindnerii Zellen ergaben dabei folgende Ergebnisse (siehe Abb. 9 , Abb. 10), die schematisch in Abb. 11 zusammengefaßt sind. Ausgehend von einer einkernigen Ascusmutterzelle erfolgt zunächst die Meiose I. Es entsteht eine zweikernige Zelle , in der entweder direkt die Sporenwandbildung stattfindet und danach eine weitere Kern-(Meiose II) und Zellteilung folgt,wobei am Ende drei bzw. vier einkernige Ascosporen pro Ascus (Abb. 11 rechts) entstehen. Oder die MeioseII findet direkt nach Meiose I statt. Dabei kann entweder eine vier- oder eine drei-kernige Zelle entstehen (Abb. 11 links und Mitte). Je nachdem, wie die Sporenwandbildung in der drei- bzw. vier-kernigen Zelle nun abläuft, d.h. je nachdem, ob jeweils ein Kern oder zwei Kerne degenerieren, entstehen zwei-, drei-, oder viersporige Asci. Schließlich können

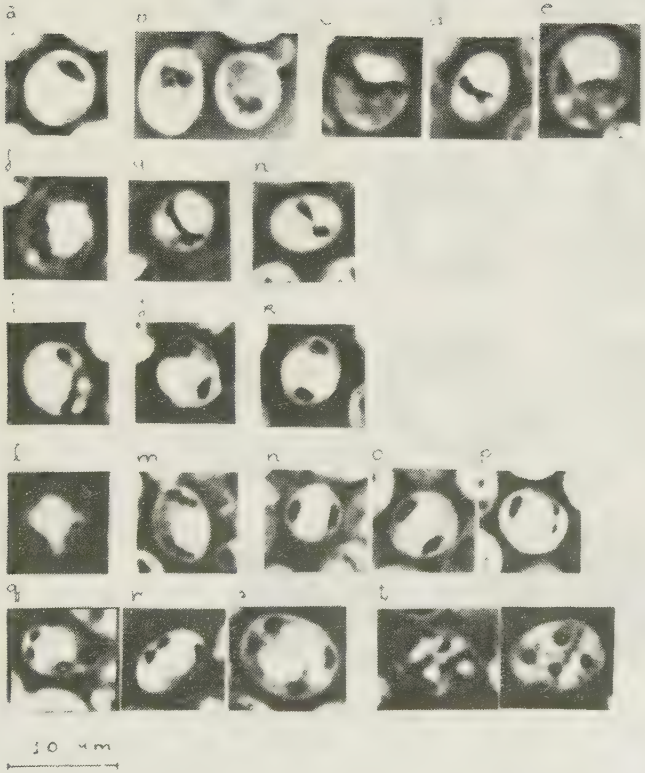


Abb. 7: Verschiedenen Meiosestadien von P.pinus DBN 70504
(a) Interphase (b) Prophase I
(c-e) Metaphase I (n=3-4) (f-n) Anaphase I (n=3-4)
(i-k) Telephase I (l) Prophase II
(m) Metapnase II (n=3-4) (n-p) Anapnase II
(q-s) Telophase II (t) Tetraden

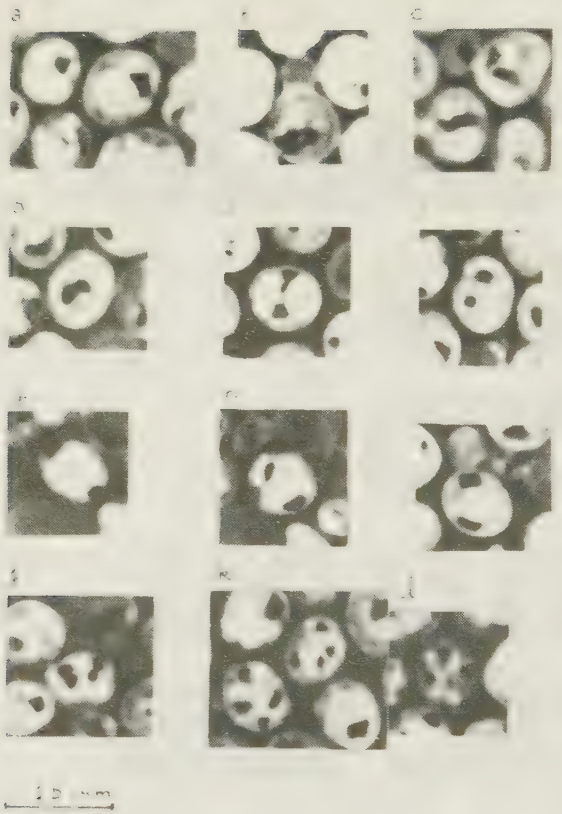


Abb. 8 : Verschiedenen Meiosestadien von P.lindneri DSM 70722
(a) Interphase I (b) Propnase I
(c) Metaphase I (linksunten)(d) Anapnase I
(f) Übergang Anapnase I-Telophase I
(g) Prophse II (h-i) Anapnase II
(j) Telophase II (k-l) Tetraden

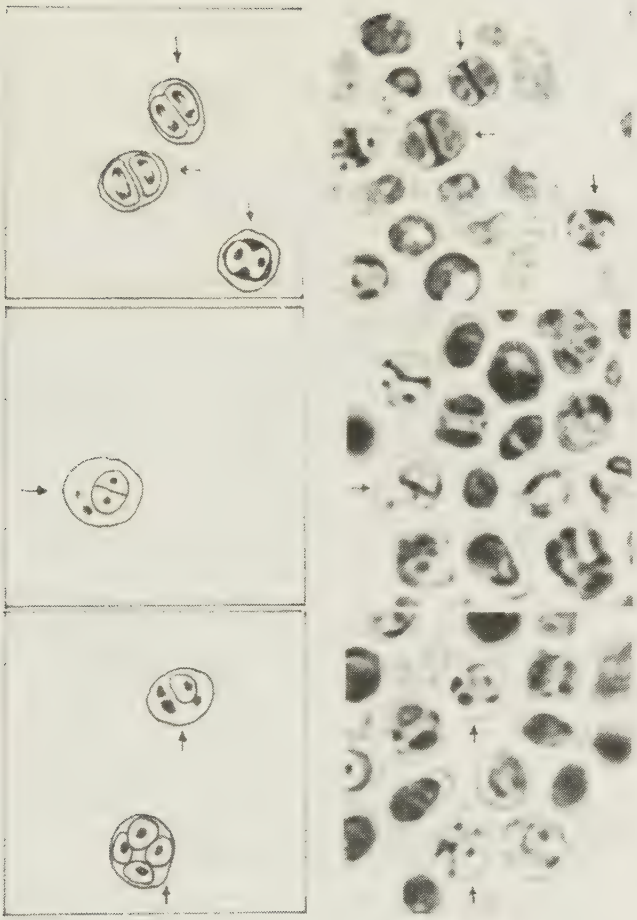


Abb.9 : P.lindneri: Mikroskopische Aufnahmen mit entsprechendem Schema der Entwicklung von Asci und Ascosporen nach Giemsa-Kernfärbung. Durch Pfeile an den mikroskopischen Aufnahmen sind die Zellen gekennzeichnet, die in der entsprechenden schematischen Darstellung wiedergegeben sind.

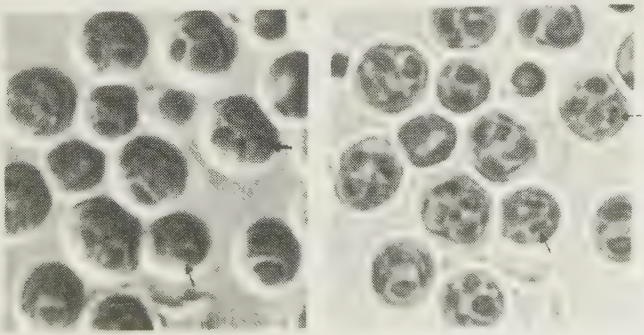


Abb. 10 : P.lindneri: reduktionelle Kernteilung in Ascosporen.

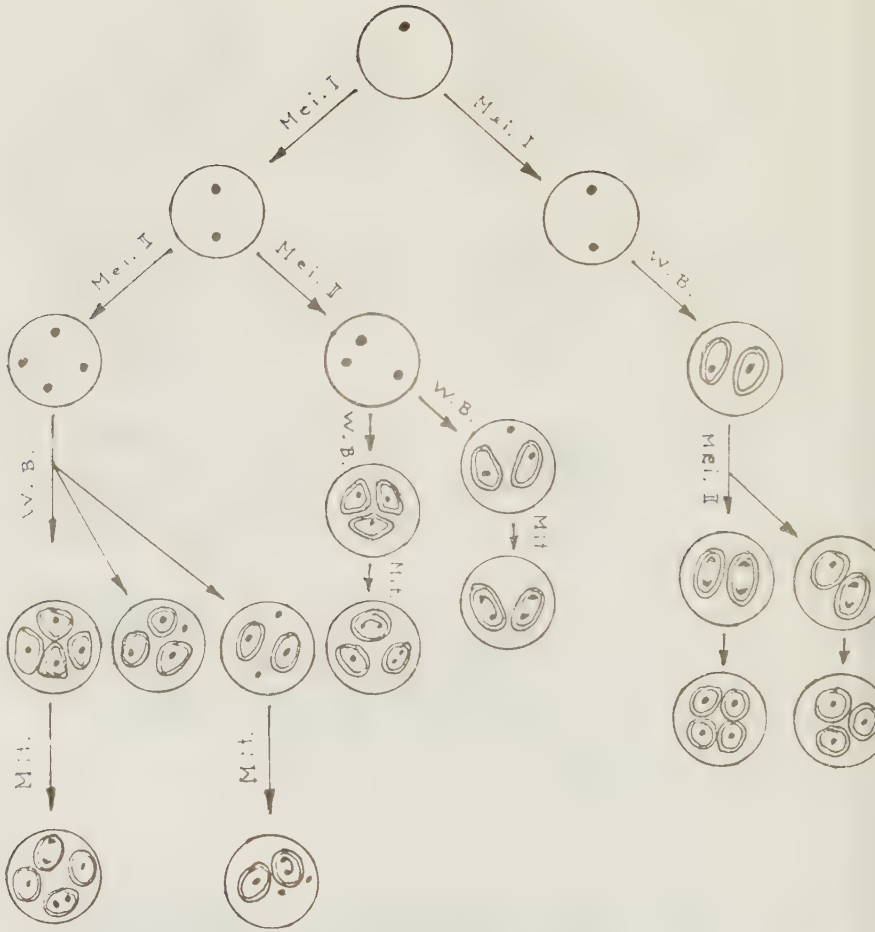


Abb. 11: Schematische Darstellung der Entstehung von zwei - und vielsporigen Asci bzw. der Kernverhältnisse

= Ascusmutterzellen bzw. Asci
= Kern
= Ascospore mit Kern
Mei = Meiose
Mit = Mitose
W.B. = Wandbildung

im Anschluß an die Sporenwandbildung in einer oder mehreren Sporen mitotische Kernteilungen ablaufen, wobei am Ende neben einkernigen auch zweikernige (Abb. 10) Ascosporen in einem Ascus enthalten sein können. Fusionsstadien zwischen Ascosporen innerhalb eines Ascus , wie für Saccharomyces cerevisiae beschrieben, konnten niemals beobachtet werden.

ab) Mitose:

Nachdem die Ascosporenbildung zytologisch untersucht wurde und dabei festgestellt werden konnte, daß die Ascosporen im Verlaufe einer meiotischen Kernteilung entstehen, sollte der Sprossungsvorgang bei P.lindnerii zytologisch verfolgt werden, um die unterschiedlichen Kernteilungstypen (Meiose und Mitose) bei der Sporenbildung und der Teilung vegetativer Zellen direkt nebeneinander vergleichen zu können.

In einer nicht sporulierenden Kultur von P. lindnerii konnten nach Feulgen-Kernfärbung Stadien der Mitose nachgewiesen werden (Abb. 12). Zunächst wird bei dieser Teilung an der Mutterzelle ein kernloser Spross gebildet, während sich der Zellkern in der Mutterzelle mitotisch teilt (Abb. 12 a-g). Nach der Telophase wandert ein Tochterkern in den Spross (Abb. 12 h), der andere verbleibt in der Mutterzelle. Der Spross entwickelt sich weiter bis zu Abschnürung (Abb. 12 i-k), worauf die Mutterzelle wieder zur nächsten Zellteilung bereit ist.

Durch die zytologischen Untersuchungen konnten die unterschiedlichen Zellteilungsarten bei der Bildung der Ascosporen und der Teilung vegetativer Zellen nachgewiesen werden. Während die Ascosporen im Verlaufe meiotischer Kernteilungen entstehen, erfolgt die Teilung vegetativer Zellen durch mitotische Kernteilungen. Damit konnte der Kernphasenwechsel bei P.pinus (DSM 70384) und P.lindnerii nachgewiesen werden, wobei die Reduktion des Chromosomensatzes im Laufe einer Meiose bei der Ascosporenbildung erfolgt.

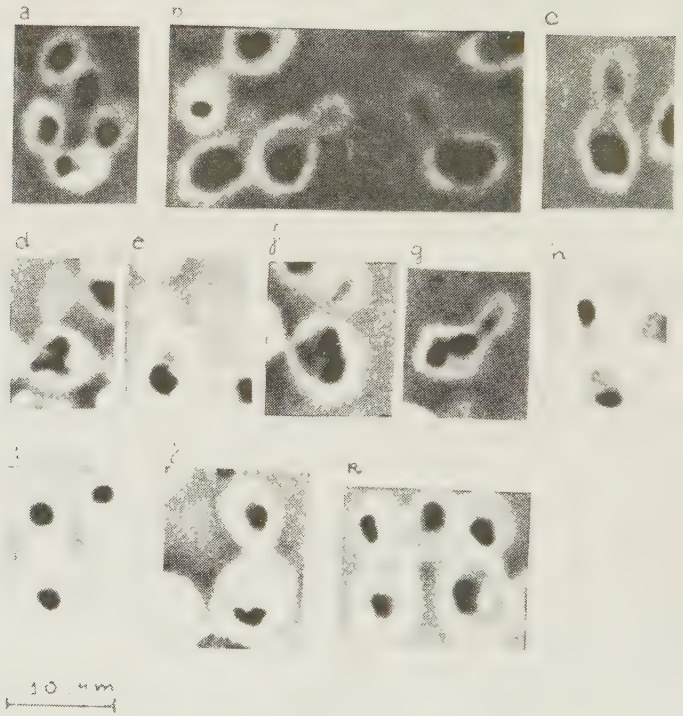


Abb.12: Mikroskoposche Aufnahmen der mitotischen Zellteilungen von K.lindneri nach Feulgen-Kernfärbung.
(a) Interphase
(b-c) Mutterzellen mit Zellkern und kernlosen Sprossen
(d-f) Anaphase
(g) Telophase
(h-l) Mutter und Tochterzellen (alle einkernig).
Die ovale graue Struktur in den einzelnen Fotos stellt eine Zelle (mit dem Spross) die dunkle Struktur einen Zellkern dar.

b. Quantifizierung des DNA-Gehaltes

Ein weiterer Nachweis des Kernphasenwechsels im Verlaufe des Entwicklungszyklus von P.pinus und P.lindnerii sollte durch die Bestimmung des DNA-Gehaltes der verschiedenen Zellen einer Kultur geführt werden.

Präsumptiv diploide (große, ovale einzelnliegende Zellen) und Haploide Zellen (Ascosporen) wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert und anschließend kultiviert. Von jeweils 3 X 10^9 Zellen aus der stationären Phase einer solchen Einzell- bzw. Einsporkultur wurde DNA extrahiert und der DNA-Gehalt des Extraktes nach Reaktion mit Diphenylamin (Farbreaktion) photometrisch bestimmt. Als vergleich wurde der DNA-Gahalt von haploiden und diploiden Klonen von S.cerevisiae bestimmt.

Der Ergebnisse dieser Bestimmung sind in Tab.10 zusammengefaßt. Aus ihr geht hervor, daß der DNA-Gehalt von Einzellkulturen (aus präsumptiv diploiden Zellen) bei allen drei Hefestämmen P.pinus DSM, P.pinus MH_4, P.lindnerii DSM höher ist als von Einsporkulturen (aus Ascosporen). Das Verhältnis des DNA-Gehaltes zwischen Einzell- und Einsporkultur liegt dabei bei den Stämmen P.pinus DSM und P.lindnerii DSM im gleichen Bereich wie bei S.cerevisiae (Stamm Bo.6, Tab.1C). Bei P.pinus $MH_4$36 dagegen liegt der Verhältniswert jedoch deutlich unter dem der übrigen Stämme. Dieser niedrige Wert könnte eventuell auf das Vorhandensein von aneuploiden Zellen in den Einzell- bzw. Einsporkulturen dieses Stammes zurückzuführen sein. Da der Stamm P.pinus $MH_4$21 nicht sporuliert, konnte hier nur der DNA-Gehalt vegetativer Zellen bestimmt werden. Dieser liegt dabei im gleichen Bereich wie bei den Zellen von Einsporkulturen der anderen Stämme. Daraus könnte geschlossen werden, daß die vegetativen Zellen dieses Stammes haploid sind.

Damit ist auch an Hand der DNA-Quantifizierung in Übereinstimmung mit den oben aufgeführten zytologischen Daten deutlich, daß bei den untersuchten Stämmen die Ascosporen im Vergleich zu den großen vegetativen Zellen einen niedrigeren Ploidiestatus aufweisen.

Stämme	µg DNA/ 3 X 10^9 Zellen Einsporkultur	Einzellkultur	Verhältnis Z/S
S.cerevisiae Bo.6	50,5 ± 4,8	84,1 ± 5,3	1,66
P.lindnerii DSM 70722	43,2 ± 2,0	75,6 ± 6,9	1,75
P.pinus DSM 70384	50,6 ± 7,7	81,9 ± 8,4	1,62
P.pinus $MH_4$36	57,5 ± 0,5	77,8 ± 14,1	1,35
P.pinus $MH_4$21	49,5 ± 8,6[a]		

Tab.10: Bestimmung des DNA-Gehaltes von P.pinus MH_4, DSM und P.lindnerii DSM mit Diphenylamin. Kalbthymus-DNA und S.cerevisiae dienten als Standard DNA bzw. Standard Organismus. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von mindestens 4 unabhängigen Versuchen.
a : Da der Stamm P.pinus $MH_4$21 nicht sporuliert, wurden zur DNA-Gehaltbestimmung vegetative Zellen verwendet.
Z : DNA-Gehalt der Zellkultur
S : DNA-Gehalt der Einsporkultur

c. Bestimmung des Zellvolumens

Da die Volumina verschiedenploider Zellen sich voneinander unterscheiden, kann auch die Bestimmung des Zellvolumens Anhaltspunkte über Unterschiede im Ploidiegrad verschiedener Zellen geben. Aus diesem Grunde wurde das Volumen von Zellen einer Einsporkultur der verwendeten Hefestämme durch Messen der Zellänge und Zellbreite einzelner Zellen (je 50 Zellen einer über 24h angezogenen Kultur) und Umrechnen nach der Formel : Volumen $= \frac{4}{3}\pi.a.b^2$ (a = Zellänge, b = Zellbreite) bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abb.13 und in Tab.11 zusammengefaßt.

Daraus ist ersichtlich, daß das Volumen von Zellen einer Einzellkultur bei allen untersuchten Stämmen in etwa um das Zweifache größer ist als bei Zellen einer Einsporkultur. Auch diese Untersuchung deutet damit darauf hin, daß Ascosporen bzw. die aus ihnen hervorgegangenen Zellen einen im Vergleich zu Zellen einer Einzellkultur niedrigeren Ploidiegrad aufweisen.

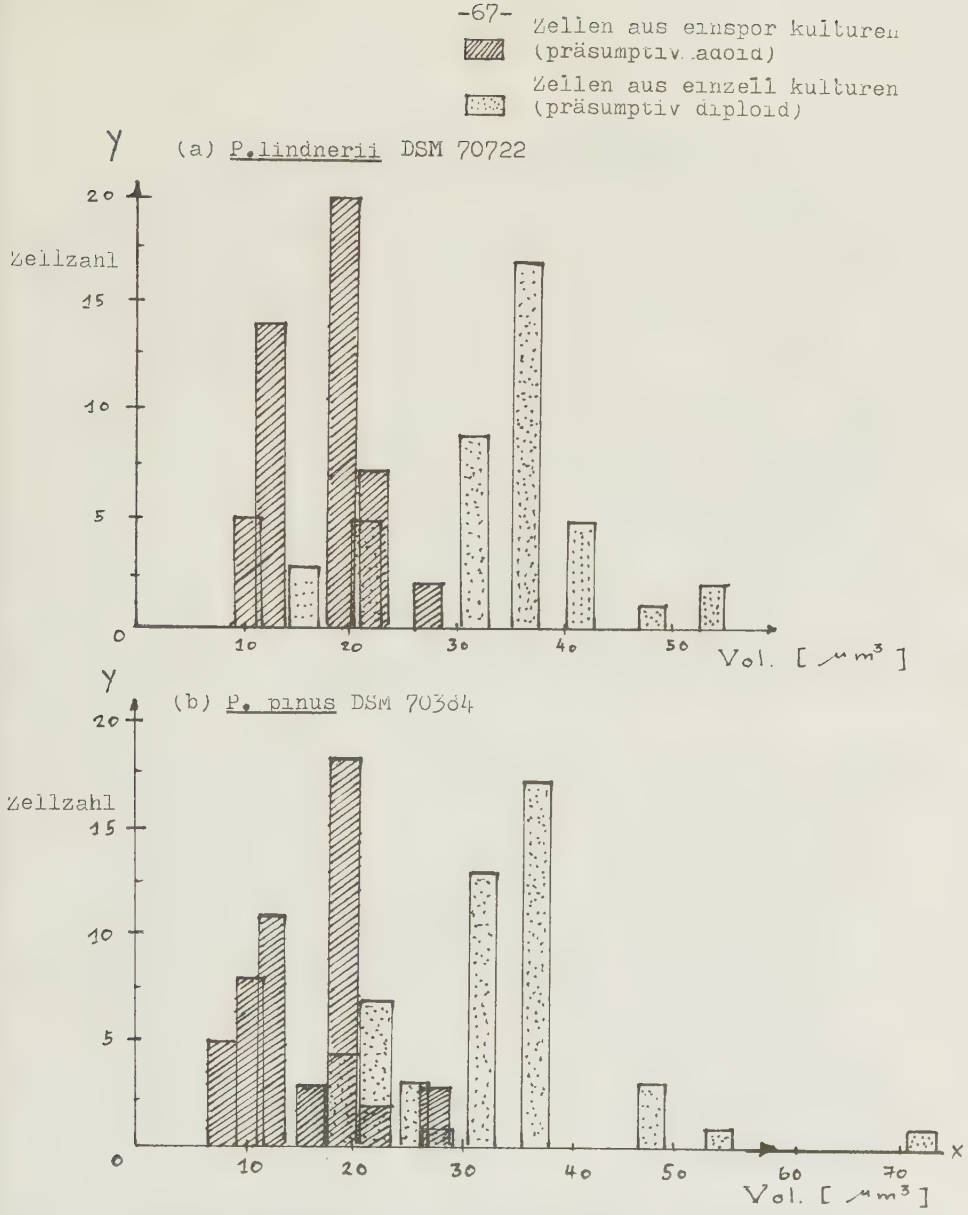
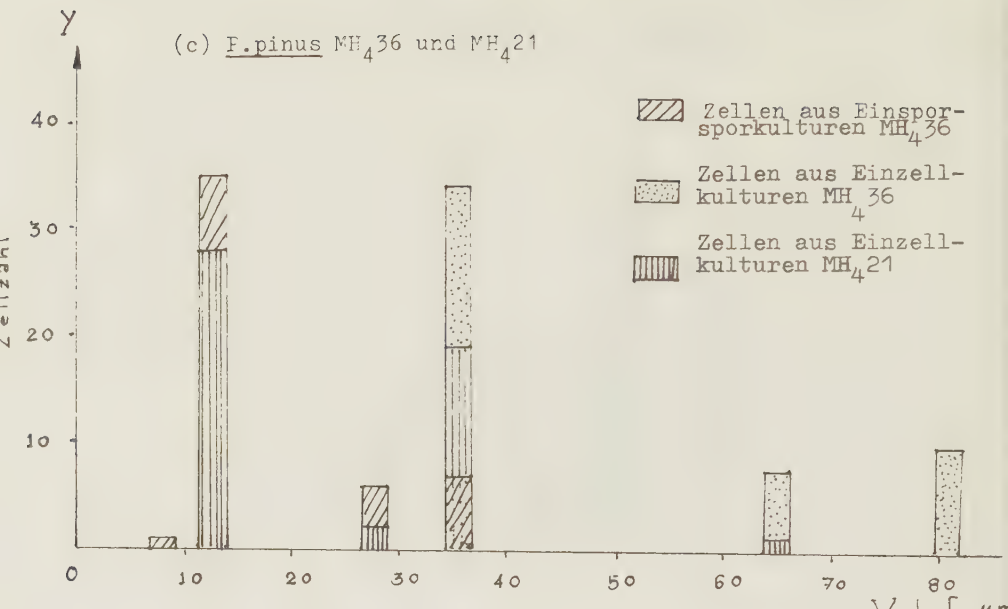


Abb. 13: Zellvolumen von je 50 Zellen einer Einsporkultur sowie einer Einzellkultur von P.lindneri DSM 70722 (a), P.pinus DSM 70384 (b) bzw P. pinus MH_4 36 (c) und P. pinus MH_4 21



Stämme	Zellvolumen in um^3 Einsporkultur	Einzellkultur
P.lindnerii DSM 70722	16,94 ± 4,58	32,71 ± 8,57
P.pinus DSM 70384	15,55 ± 5,23	32,81 ± 9,95
P.pinus $HM_4$36	18,54 ± 11,53	48,94 ± 18,43
P.pinus $MH_4$21	23,29 ± 13,32	

Tab.11: Bestimmung des Zellvolumens der verwendeten Pichia Stämme. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 50 Einzelmessungen mit ihren Standardabweichungen.

d. Unterscheidung des Ploidiegrades von Einzell- bzw. Einsporkulturen mit Hilfe eines spezifischen Farbtestes.

YE-Medium, dem Phloxin und Trypanblau zugesetzt ist, erlaubt bei Saccharomycodes ludwigii die Unterscheidung zwischen haploiden und homozygotdiploiden Kulturen (Yamazaki und Oshima 1979). Homozygot-diploide Kulturen unterscheiden sich dabei in ihrer Farbe von haploiden schon makroskopisch.

> Spezifische Farbtests auf Agarplatten werden für verschiedene Zwecke angewandt. So verwendeten Nagai (1963) und Tom und Wilkie (1966) Phloxin (Magdala) allein und Middlehoven (1976) Phloxin mit Trypanblau oder Eosin mit Trypanblau zur Isolation von Atmungsdefektmutanten sowie von auxotrophen Mutanten. Auf diesen Medien bilden solche Mutanten kleine rote bzw. violette Kolonien, während Kolonien des Wildtypes größer sind und nur eine schwache Färbung aufweisen. Eine physiologische Erklärung der Farbunterschiede bei den verschiedenen Kolonien gibt es bisher nicht (Yamazaki und Oshima 1979).

Dieser Farbtest wurde als ein weiterer Test für den Nachweis eines Kernphasenwechsels bei den verschiedenen Hefestämmen verwendet. Wie aus Abb. 14 hervorgeht, unterscheiden sich Einzell- und Einsporkulturen von P.lindnerii und P.pinus deutlich in der Koloniefarbe nach Inkubation bei 25°C und 30° nach 4 d bis zu einem Monat. Bei 35°C konnte dieser Unterschied nicht nachgewiesen werden.

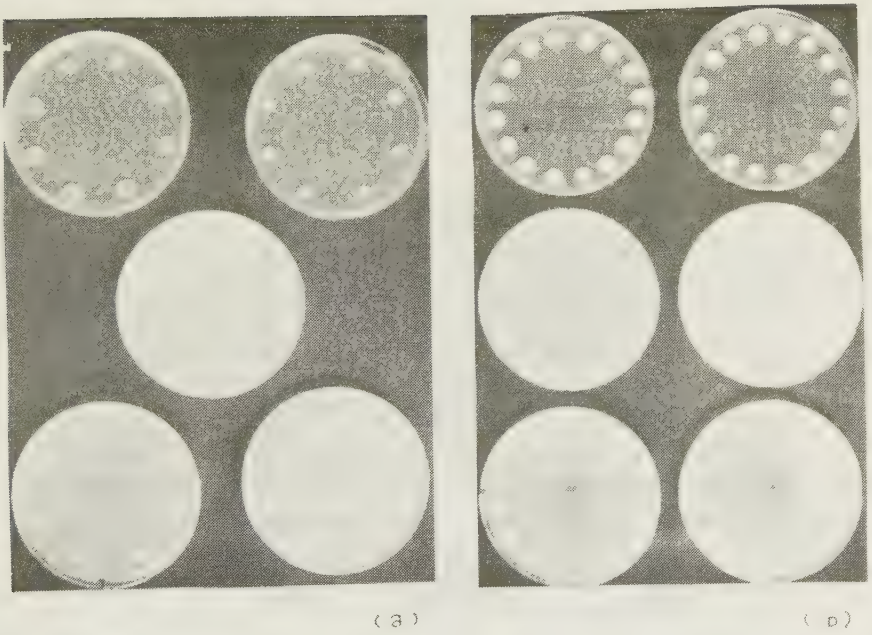
Die Farbreaktion der homozygot-diploiden Kolonien tritt nach etwa 4 d auf. Da sporulierende Kolonien (Einzellkulturen) mit der Sporulation auch erst nach einer Inkubationszeit von ca. 4 d beginnen, stellt sich die Frage, ob die Farbreaktion in Korrelation mit der Sporulation steht. Aus diesem Grunde wurden auf RG-Medium (Restrict-Growth Medium) bzw. auf YE-Medium dem Phloxin und Trypanblau zugesetzt wurden, Einzell- bzw. Einsporkulturen bei verschiedemen Temperaturen kultiviert und makroskopisch nach Ascosporenbildung untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 15, 16 und Tab. 12 zusammengefaßt.

Stämme	Koloniefarbe auf YE+F(25°C,30°C)	Frequenz der Ascibildung (%) bei 25°C auf YE+F	auf RG	bei 30°C auf YE+F	auf RG
P.lindnerii DSM 70722 Einsporkultur	hell-violett	0 (521)	0 (335)	0 (806)	0 (205)
Einzellkultur	dunkelviolett	3 (618)	5 (724)	5 (548)	15 (366)
P.pinus MH_4 36 Einsporkultur	hell-violett	0 (554)	0 (183)	0 (310)	1 (161)
Einzellkultur	lila-rot	19 (365)	32 (92)	0 (230)	26 (69)

Tab.12: Korrelation der Ascosporenbildung mit der Koloniefarbe von Einsporkulturen und Einzellkulturen von P.lindnerii und P.pinus, die bei verschiedenen Nährmedien und bei unterschiedlichen Temperaturen kultiviert wurden. In Klammern ist die Gesamtzahl der gezählten Zellen angegeben, aus der die Frequenz der Ascusbildung bestimmt wurde.

An Hand der Tabelle wird deutlich, daß eine Korrelation zwischen Sporulation und Farbreaktion zumindest bei P.lindnerii besteht. Alle Einzellkulturen sporulieren hier und zeigen die Farbreaktion, während Einsporkulturen weder sporulieren noch den charakterischen Farbumschlag zeigen.

Bei P.pinus MH_4 gilt eine solche Korrelation bei einer Inkubationstemperatur von 25°C ebenfalls. Bei 30°C auf YE-Medium+Farbstoff dagegen tritt die Farbreaktion unabhängig von der Sporulation auf. Auch die hier dargestellten Untersuchungen bestätigen damit die Annahme eines Kernphasenwechsels bei den verwendeten Hefestämmen. Da damit verschiedenste Verfahren zum gleichen Ergebnis geführt haben, muß ein solcher Kernphasenwechsel bei den entsprechenden Hefestämmen als nachgewiesen betrachtet werden.



(a) (b)

Abb. 15: Einzellkulturen (a) bzw. Einsporkulturen (b) von P.lindnerii DSM 70722:
Jeweils links bei 25°C, recht bei 30°C; von oben nach unten: auf YE-Medium + Farbstoffe, auf YE-Medium ohne Farbstoffe und auf RG-Medium

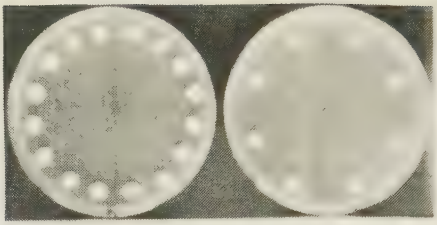


Abb. 14: Farbunterschiede zwischen Einsporkulturen (links) und Einzelkulturen (rechts) auf YE Medium + 10 µg/ml Phloxin und 15 µg/ml Trypanblau bei 25° C 7 d (von P. lindneri DSM 70722).

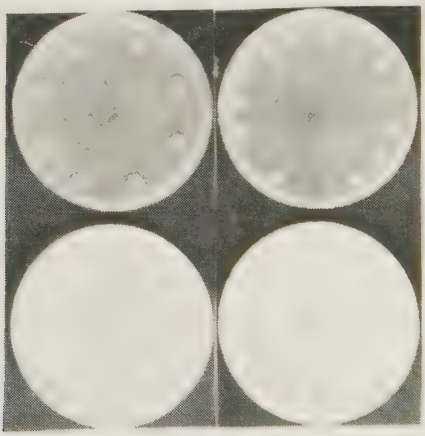


Abb. 16 : Einzelkulturen (links) bzw. Einsporkulturen (rechts) von P. pinus MH436 auf YE-Medium+Farbstoffe (oben) und auf MG-Medium (unten). 7 d Inkubation bei 30° C.

2. Nachweis von Kreuzungstypen:

Als Voraussetzung für später durchgeführte Kreuzungsversuche sollte die Frage geklärt werden, ob für P.lindneriï DSM 70722 und P.pinus DSM 7[illegible] -typen nachweisbar sind oder nicht. Schließlich sollten die für P.pinus (NH_A21, NH_A36) angegebenen Kreuzungstypen überprüft werden.

Als Voraussetzung würde zunächst angenommen, daß Einsporkulturen jeweils einen der beiden komplementären Kreuzungstypen tragen. Diese Kreuzungstypen sollten nach Kreuzung zweier komplementärer Einsporkulturen [illegible] Tetraden der Asci im Verhältnis von 1:1 aufspalten. Alle Kreuzungen zwischen Eltern verschiedenen Kreuzungstyps sind dabei kompatibel. Dies bedeutet dann, daß von den möglichen Kreuzungen von Abkömmlingen der Ascosporen eines Ascus nur vier kompitabel wären und sporulieren würden.

Um dies abzuklären, wurden eine größere Anzahl von Einsporkulturen jeweils eines Ascus in allen möglichen Kombinationen sowohl mit der Hilfe der [illegible] -Kreuzungstechnik (nach Lindegren) als auch nach der [illegible] -Methode" miteinander "gekreuzt". Keine dieser "Kreuzungskombinationen", aber auch keine der allein kultivierten Einsporkulturen (Kontrollkulturen) zeigten auch nur eine Spur von Sporulation. Erst nach einer 15 d Inkubation, trat in sämtlichen "Kreuzungskombinationen", aber auch in einigen der Kontrollkulturen) sporulierende Sektoren auf. Dies bedeutet, daß es für den Ablauf einer Meiose und Sporenbildung überhaupt keine Rolle spielt, ob nur Einsporkulturen oder Kombinationen von Einsporkulturen vorliegen. Vor allem die festgestellte Sporulation von Einsporkulturen kann wohl als Hinweis dafür betrachtet werden, daß offenbar keine (oder relativ rasch konvertierende) Kreuzungstypen vorliegen. Da die Voraussetzung für [illegible] Sporulation eine Diploidisierung ist, läßt sich dieser Kernphasenwechsel vermutlich auf einen Selbstungsprozeß zurückführen.

Prinzipiell kann eine Selbstung durch [illegible] von genetisch identischen Zellen, [illegible] homogene Zygoten entstehen, ablaufen [illegible] auf Grund einer Diploidisierung. Beim letzteren Prozeß kommt es jedoch zu keiner [illegible], sondern der Übergang von haploid zu [illegible]

z.B. durch eine Endomitose (oder einem vergleichbaren Vorgang) bewerkstelligt.

Hinweise, die auf eine Fusion der Kreuzungspartner gedeutet hätten, konnten nicht erhalten werden, da mikroskopisch keine Fusionsstadien festgestellt werden konnten. Allerdings ist eine Visualisierung nur möglich, wenn die Fusionsfrequenz entsprechend hoch ist. Um auch bei sehr geringen Fusionsraten Fusionen feststellen zu können, wurden in der nächsten Versuchsreihe von den Kreuzungspartnern die Zellwände enzymatisch entfernt, um so "künstlich" die Fusionsfrequenz zu erhöhen.
Nach Fusion von Protoplasten verschiedener Einsporkulturen zeigten ein Teil der regenerierten Kolonien nach kurzer Zeit (ca. 7-10 d) Sporulation und zwar diesmal nicht nur in kleinen Sektoren, sondern in der gesamten Kolonie. Da jedoch auch regenerierte Protoplasten einer Einsporkultur ein genau gleiches Sporulationsverhalten zeigten, kann aus den Experimenten nicht geschlossen werden, daß es bei der Kreuzung von Protoplasten zweier Einsporkulturen unbedingt zur Fusion zweier genetisch verschiedener Zellen gekommen ist. Vielmehr scheint, um ein entsprechendes Sporulationsverhalten zu zeigen, eine Diploidisierung notwendig zu sein. Dabei kann diese Diploidisierung zwischen genetisch gleichen oder möglicherweise genetisch verschiedenen Zellen ablaufen. Das Vorhandensein von Kreuzungstypen ließ sich daher auch auf Grund dieser Protoplastenfusionsuntersuchungen nicht nachweisen.

Im Gegensatz dazu gelang es jedoch, wie in der Einleitung schon darauf hingewiesen (siehe s. 73), der Arbeitsgruppe um S.V. Benevolensky bei P.pinus Kreuzungstypen nachzuweisen.

Freundlicherweise wurden zwei Stämme ($MH_4$21 und $MH_4$36), die unterschiedliche Kreuzungstypen tragen sollen, von dieser Arbeitsgruppe für Vergleichsuntersuchungen zur Verfügung gestellt.

Die beiden Stämme $MH_4$21 und $MH_4$36 wurden nach Nitrosoguanidin-Mutagenese von einem P.pinus Wildstamm isoliert. Sie sind folgendermaßen charakterisiert: $MH_4$21, methionin-auxotroph, heterothallisch, Kreuzungstyp-a ; $MH_4$36, lysin-auxotroph, homothallisch, Kreuzungstyp-α. Beide Stämme lassen sich gut auf MM-Medium kreuzen.

Um Kreuzungstypen nachweisen zu können, wurde der Stamm $MH_4$21 auf RG-Medium bei 30°C angezogen und dadurch die Sporulation induziert.(S.V. Benevolensky, pers. Mitteilung) Unter diesen Bedingungen sollten nach Benevolensky die viersporigen Asci zwei Sporen des Kreuzungstyp-a und zwei Sporen des Kreuzungstyp-α enthalten (siehe Genkonversion bei Kreuzungstypen ,Kap. I-A-2). Einsporkulturen von allen Ascosporen eines solchen viersporigen Ascus dienten im weiteren als Teststämme. Zellen jeweils einer der vier verschiedenen Einsporkulturen, die entweder den Kreuzungstypα oder a tragen sollten, wurden gegen Zellen von Einsporkulturen des Stammes $MH_4$36 (Kreuzungstypα) gekreuzt. Statt einer erwarteten Aufspaltung von 1:1 zeigten jedoch alle Kreuzungsprodukte den gleichen Phänotyp, nämlich Prototrophie und Sporulation.

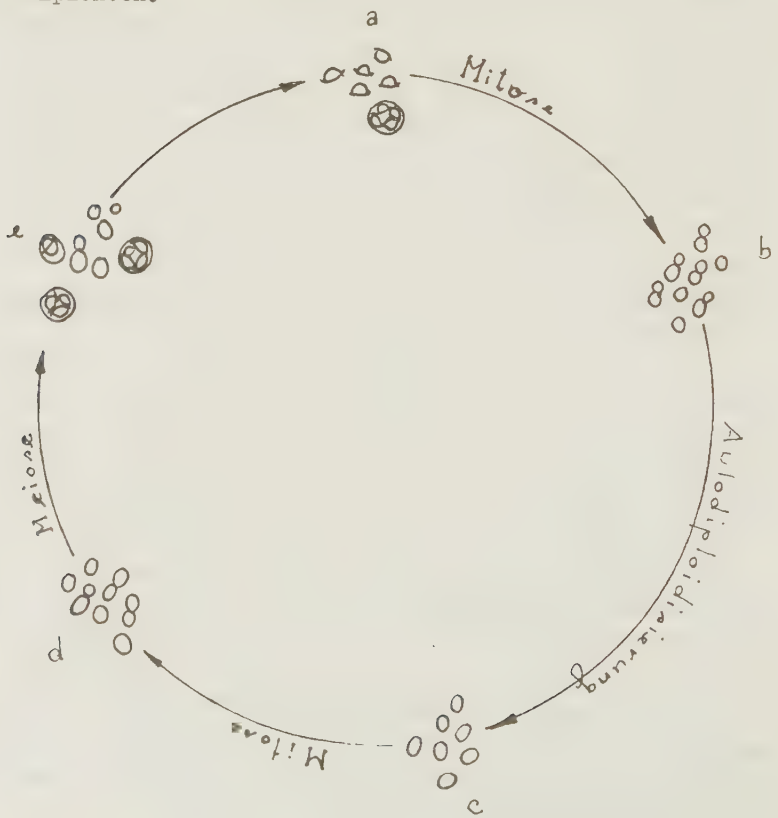
Anhand dieser Untersuchungen ist evident, daß entgegen der Daten von Benevolensky auch bei beiden Teststämmen ($MH_4$21 und $MH_4$36) von P.pinus keine Kreuzungstypen nachgewiesen werden konnten. Bei dem Stamm $MH_4$36 kann diese Aussage allerdings nicht mit letzter Konsequenz gemacht werden, da dieser Stamm wohl den Kreuzungstypα tragen soll, aber zusätzlich noch homothallisch ist und also selbsten kann. Es wäre hier theoretisch möglich, daß auf Grund eines möglichen Kreuzungstyp-Konversionsmechanismus nicht nur Zellen eines Kreuzungstyps vorliegen, sondern stets eine Mischung beider Kreuzungstypen.

Auch durch Vergleichsuntersuchungen konnten somit keine konkreten Hinweise erhalten werden, daß bei P.pinus Kreuzungstypen vorhanden sind. Der Kernphasenwechsel hin zum diploiden Zustand wird offenbar durch Selbstung bewerkstelligt. Dabei kommt es jedoch zu keiner Plasmo- und Karyogamie, da weder Zellfusionsstadien festzustellen waren noch genetische Hinweise, wie an entsprechender Stelle ausführlich dargestellt wird, erhalten wurden. Anhand dieser Daten scheint eine Autodiploidisierung z.B. durch eine Endomitose den Übergang vom haploiden zum diploiden Zustand zu verursachen. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß es zu einer Fusion des genetischen Materials von Mutter- und Tochterzelle kommt, noch bevor sich die beiden voneinander getrennt haben.

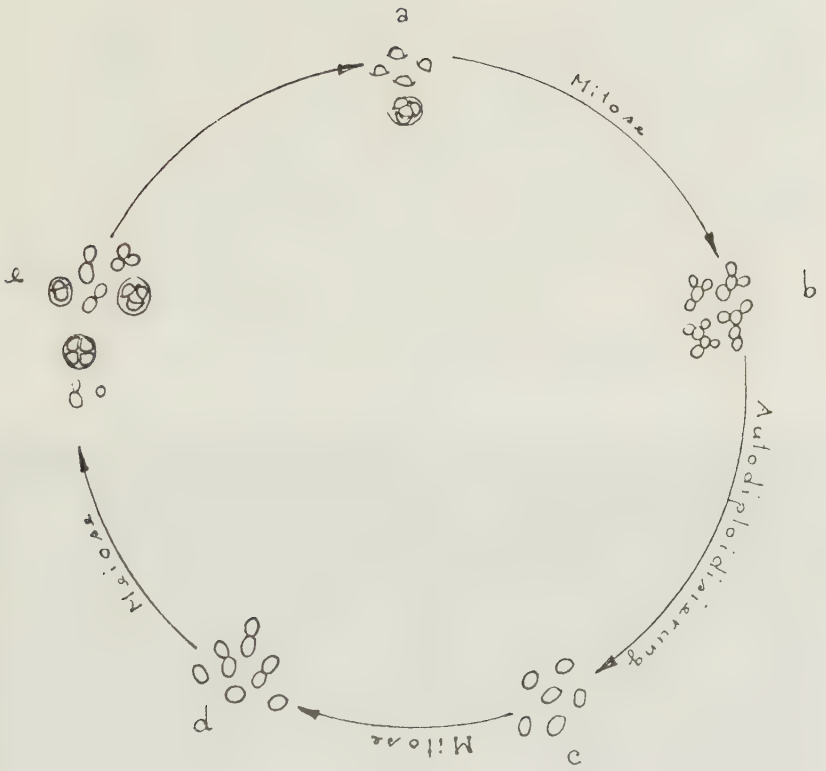
3. Die Entwicklungszyklen von P.lindnerii und P.pinus

Aus den bisher beschriebenen Untersuchungen lassen sich die in Abb.17a und b dargestellten Entwicklungszyklen für P.lindnerii und P.pinus ableiten. Haploide Sporen der beiden Hefearten vermehren sich vegetativ und bilden haploide Kulturen, in denen es durch Fusion von Zellen (Mutter- mit Tochterzelle) oder durch Endomitose zu einer Autodiploidisierung kommt. Die dabei entstandenen diploiden Zellen teilen sich mitotisch. Dadurch entstehen diploide Kulturen, in denen nach meiotischen Kernteilungen Asci mit haploiden Ascosporen entstehen. Diese können schließlich sofort wieder zu haploiden Kolonien auskeimen.

Die Entwicklungszyklen der beiden Hefen weisen somit einen Kernphasenwechsel auf und sie beide sind Haplo-Diplonten.



(a)



(b)

Abb. 17: Entwicklungszyklus von P.lindneri (a), P.pinus (b)
a) Ascus mit haploiden Ascosporen
b) haploide Kultur
c) diploide Zellen
d) diploide Kultur
e) sporulierende Kultur mit Asci und Ascosporen

C. DNA-Analyse

Bei der Kultivierung der verwendeten Hefestämme auf festen Medien konnte ein Phänomen beobachtet werden, das als Sektorierung bekannt ist. Dabei handelt es sich um während des Wachstums einer Kolonie auftretende, zur sonstigen Kolonie unterschiedlich wachsende Bereiche (siehe Abb. 18). Diese Sektoren unterscheiden sich auch im Sporulationsverhalten von der sonstigen Kolonie, d.h. in diesen Bereichen findet entweder keine Sporulation statt, während die übrigen Teile sporulieren, oder gerade diese Bereiche sporulieren, während die sonstigen Bereiche keine Sporulation zeigen.

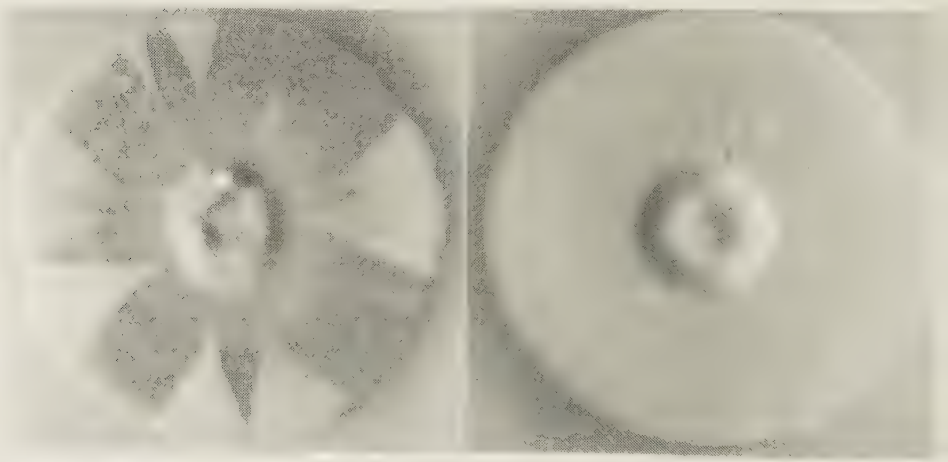


Abb. 18: P. lindneriі
(a) nichtsporulierende Sektoren in sporulierender Kolonie einer Einzellkultur.
(b) sporulierender Sektor in nichtsporulierender Kolonie einer Einsporkultur.

Da Sektorbildung auch für andere Organismen wie Aspergillus niger (Osiewacz 1980) beschrieben ist und hier im Zusammenhang z.B. mit der Herabregulierung von diploiden zum haploiden Zustand oder aber in anderen Fällen mit dem Vorkommen von zytoplasmatischen Faktoren in diesen Bereichen zusammenhängen (Novick, 1980) sollte die gesamte DNA der verwendeten Hefestämme aufgearbeitet und charakterisiert werden; dieses auch deshalb,um eine Aussage über die verwandtschaftlichen Beziehungen der verwendeten Klone machen zu können.

1. Dichtebestimmung und GC-Gehalt:

Die DNA-Dichte der Gesamt-DNA verschiedener DNA-Präparationen der einzelnen Hefestämme wurde in der analytischen Ultrazentrifuge analysiert. Die repräsentativen DNA-Spektren sind in Abb. 19 dargestellt. Neben einem Hauptpeak trat jeweils ein Nebenpeak bei allen DNA-Präparationen auf.

Bei dem Hauptpeak handelt es sich auf Grund des Mengenverhältnisses, der höheren Schwimmdichte (Abb. 19) und damit des höheren GC-Gehaltes sowie auf Grund von Ergebnissen aus Restriktionsanalysen um Kern DNA. Die DNA des Nebenpeaks weist eine deutliche niedrigere Dichte und somit einen niedrigeren GC-Gehalt auf. Solche Verhältnisse sind charakteristisch für mitochondriale DNA's bei Pilzen, für die ein GC-Gehalt von ca. 18 % beschrieben ist (Kück 1981). Aus diesem Grunde muß die DNA des Nebenpeaks als mitochondriale DNA angesehen werden. Zusätzliche DNA Species wie etwa Plasmid DNA konnten weder in sporulierenden noch in nichtsporulierenden Kulturen nachgewiesen werden.

Aus der Gegenüberstellung vor allem der nukleären Schwimmdichten bzw. GC-Gehalte der verschiedenen Hefeklone ist ersichtlich (siehe Tab. 13), daß, wie erwartet, zwischen P.pinus und P.lindnerii erhebliche Unterschiede (im Mittel 7 mg/cm^3) vorhanden sind. Eine relativ große Divergenz (2,5 mg/cm^3) ist jedoch auch zwischen den beiden P.pinus-Stämmen (MH_4 und DSM) vorhanden. Dies läßt vermuten, daß es sich evtl. um unterschiedliche Arten handeln könnte; auch die Unterschiede ihrer mt DNA's sprechen dafür.

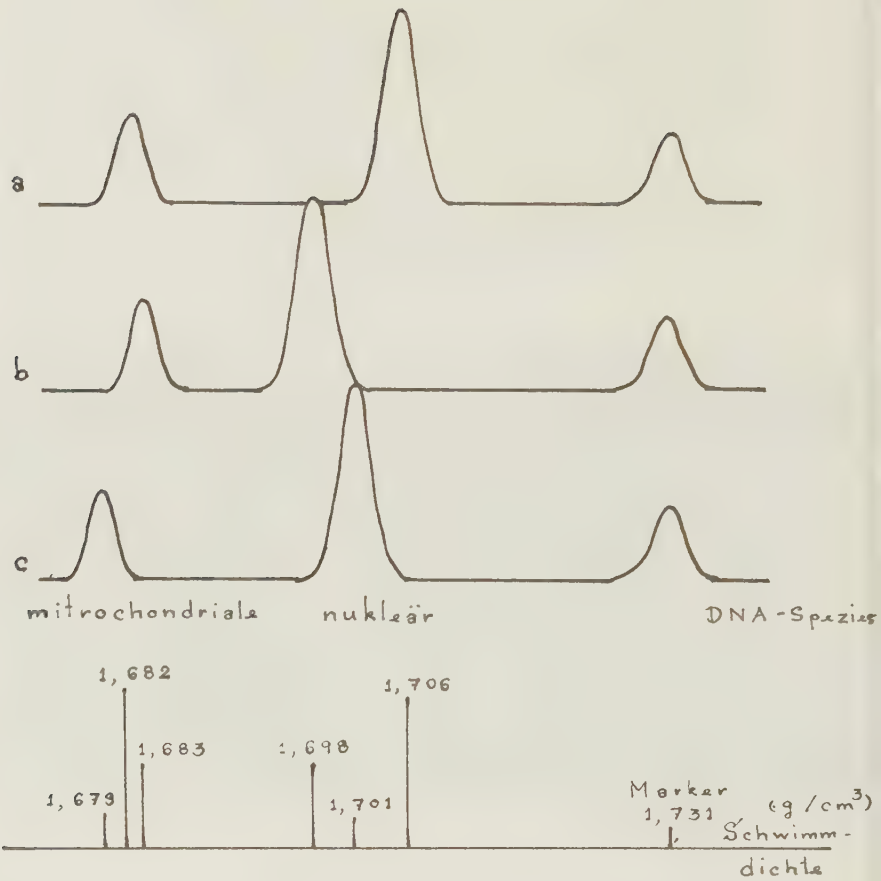


Abb. 19: Repräsentative DNA Spektren der Gesamt DNA von
a. Pichia lindnerii DSM 70722
b. Pichia pinus $MH_4$36 bzw. $MH_4$21
c. Pichia pinus DSM 70384
nach CsCl Dichtegradientenzentrifugation. Als Marker diente DNA von Micrococcus lysodeiktus.

Stämme	Schwimmdichte g/cm^3		GC-Gehalt %	
	n-DNA	mt-DNA	n-DNA	mt-DNA
P.lindnerii	1.7065∓0009	1.6819∓0017	47,45∓0.92	22,35∓1,73
P.pinus DSM	1.7007∓0013	1.6791∓0009	41,53∓1.33	19,49∓0,92
P.pinus MH_4	1.6982∓0002	1.6826∓0002	39.08∓0.2	23,16∓0,2

Tab. 13: Schwimmdichte und GC-Gehalt der n- und mtDNA der verwendeten Stämme. Es handelt sich um Mittelwerte von 7-9 unterschiedlichen Isolationen.

2. Restriktionsanalyse der mtDNA:

Eine Möglichkeit, eine DNA zu charakterisieren, ist die Restriktionsanalyse. Die durch Hydroxylapatitsäuren-Chromatographie angereicherte und durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigte mtDNA der verschiedenen Hefestämme wurde einer solchen Analyse unterzogen. Die erhaltene hochgereinigte mtDNA (ca. 10-20 µg pro 10 g Hefefeuchtgewicht) wurde mit insgesamt 7 verschiedenen Restriktionsendonukleasen in verschiedenen Kombinationen verdaut. Alle Enzyme ergaben charakteristische Fragmentmuster. Die Berechnungen der Fragmentgröße (Verwendung von 1,0 %igen bzw. 0,6 %igen Agarosegelen) ergaben sich aus mindestens vier Versuchswiederholungen.

An Hand der Summe der jeweiligen Fragmentgrößen, die für P.lindnerii in Tab. 14, für P.pinus MH_4 in Tab. 15 und für P.pinus DSM in Tab. 16 zusammengefaßt sind, lassen sich die mtDNA's dieser drei Hefeklone nicht nur charakterisieren,sondern auch voneinander unterscheiden.

Wie aus Tab. 17 zu entnehmen ist, treten dabei erhebliche Unterschiede in der Größe auf. Um diese Divergenzen noch zu verdeutlichen, sind zusätzlich in Abb. 19 exemplarisch die Restriktionsmuster von drei unterschiedlichen Einfachverdauungen dargestellt. Wie ersichtlich, sind auch hier keinerlei Gemeinsamkeiten der mtDNA's der untersuchten Klone erkennbar.

b. Restriktionsanalyse der mtDNA

P.lindnerii DSM

Fragment-Nummer	BglII	ClaI	EcoRI	EcoRI+ PstI	HpaII	BglII +ClaI	HaeIII +ClaI	Eco RI +BglII	HindIII
1	19.80	19.75	19.90	19.17	14.90	11.45	17.37	18.70	10.84
2	17.00	16.05	13.96	13.40	10.21	9.92	12.95	14.07	9.96
3	15.20	14.62	10.95	6.22	9.28	8.66	8.37	7.20	7.77
4	2.40	4.86	6.40	5.12	6.14	6.75	6.42	3.55	7.32
5			3.54	5.12	5.92	6.75	4.96	3.23	5.72
6				3.62	4.43	5.06	1.35	2.59	3.78
7					1.48	2.40	1.35	2.37	2.02
8						1.85	1.26	1.80	1.60
9								1.46	1.41
10									0.85
Σ Kb	54.40	55.28	54.75	52.65	52.36	52.79	54.03	54.97	51.27

Tab. 14: Bestimmung der Fragmentgrößen von P.lindnerii mtDNA nach Verdauung mit verschiedenen Restriktionsenzymen. In der Tabelle sind Mittelwerte von mind. 4 unabhängigen Versuchen angegeben.

$n = 9$
$\bar{x} = 53.61$
$s = 1.386$

Pichia pinus MH_4

Fragment-Nummer	EcoRI	EcoRI +PstI	EcoRI +BglII	HindIII	ClaI +EcoRI	HpaII	HaeIII	HaeIII +PstIII	ClaI +HaeIII	HaeIII +EcoRI
1	17.25	17.25	17.00	16.00	14.00	16.00	14.00	14.00	14.00	7.80
2	14.50	14.50	13.65	8.50	9.46	6.00	6.60	6.60	5.70	6.60
3	2.80	2.775	2.78	6.80	7.05	4.20	6.60	6.60	4.75	6.05
4	1.53	1.52	1.625	4.15	2.76	3.35	4.75	4.70	4.75	4.725
5					1.53	2.45	1.62	1.62	1.84	2.78
6							0.88	0.885	1.605	1.62
7							0.88	0.885	0.88	1.62
8									0.88	1.27
9										0.885
10										0.885
Σ Kb	36.08	36.045	35.055	35.45	34.80	34.28	35.33	35.29	34.405	34.235

$n = 10$
$\bar{x} = 35.097$
$s = 0.21$

Tab.15: Bestimmung der Fragmentgrößen von P.pinus MH_4 mtDNA nach Verdauung mit verschiedenen Restriktionsenzymen. In der Tabelle sind Mittelwerte von mindestens 4 unabhängigen Versuchen angegeben.

P.pinus DSM [illegible]

Fragment-Nummer	ClaI	EcoRI	EcoRI +PstI	HaeIII	HaeIII +PstI	HpaII	ClaI +HaeIII	ClaI +EcoRI	HaeIII +EcoRI	HindIII	BglII	BglII +PstI	BglII +ClaI	EcoRI +BglII
1	26.06	26.83	27.30	21.60	20.50	17.10	20.00	20.50	20.00	21.55	15.30	15.20	15.20	14.72
2	22.25	21.86	23.15	18.75	18.50	15.67	11.80	16.15	12.00	9.76	9.83	9.975	9.23	9.05
3	17.3	16.02	15.50	11.60	11.65	12.48	10.80	15.10	12.00	9.76	9.27	9.40	9.23	7.05
4	9.60	5.62	5.42	11.60	11.65	10.725	9.90	9.20	12.00	8.725	7.15	7.30	7.33	6.62
5	1.65	2.76	2.675	11.60	11.65	9.925	9.20	5.25	5.60	7.65	6.65	6.85	6.89	5.78
6		1.83	1.80	4.64	4.60	3.80	4.80	2.76	4.80	2.89	5.83	6.60	6.01	4.87
7						3.625	4.55	2.38	3.70	2.79	4.80	4.90	5.00	3.83
8						2.965	2.05	1.73	2.75	2.41	4.80	4.90	3.96	3.56
9						1.91	1.78	1.73	1.83	2.275	3.81	3.84	2.70	2.98
10						1.27	1.29	1.06	1.83	2.12	3.81	3.84	2.50	2.75
11							1.04	0.91	1.25	1.73	2.45	2.485	2.14	2.38
12										1.73	1.99	2.01	2.02	2.17
13											0.87	0.88	1.72	2.17
14													1.26	2.01
15													1.085	1.86
16													0.86	1.71
17														0.86
Σ Kb	77.06	74.92	75.545	78.79	78.55	79.50	77.13	76.77	78.76	73.39	76.56	77.58	77.075	74.29

n = 14
$\bar{x}$ = 76.85
s = 1.799

Tab. 16: Bestimmung der Fragmentgrößen von P.pinus DSM mtDNA. Angegeben sind Mittelwerte von mindestens 5-7 unabhängigen Versuchen.

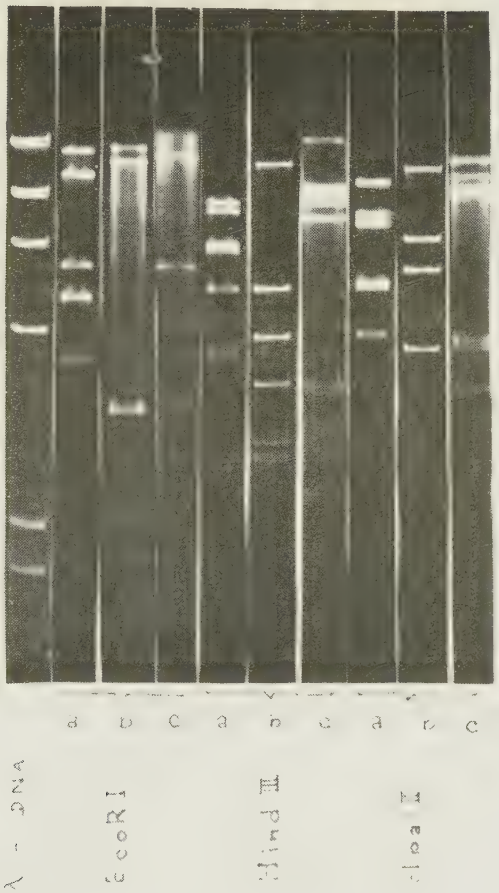


Abb. 20: Restriktionsmuster der mtDNA von P.lindneriі (a), P.pinus NH_4 (b) und P.pinus DSM (c) in Einfachverdauungen mit EcoRI, Hind III und Hpa II, (0,6 % Agarosegel).

	Größe (Kb)	Umfanglänge (µm)	Molekulargewicht (MG)
P.lindnerii	53,61±1,39	17,1	35,3
P.pinus MH_4	35,1±0,21	11,2	23,1
P.pinus DSM	76,85±1,8	24,5	50,7

Tab. 17: Physikalische Charakterisierung der mtDNA's von P.lindnerii, P.pinus MH_4 und P.pinus DSM.

Damit kann auch auf Grund der Restriktionsanalysen der mtDNA's davon ausgegangen werden, daß es sich bei den mit P.lindnerii und P.pinus bezeichneten Klonen um unterschiedliche Arten handelt. In Einklang mit den schon bei der Schwimmdichteanalyse erhaltenen Daten, zeigte auch die Restriktionsanalyse der mtDNA's der beiden P.pinus-Stämme starke Unterschiede sowohl in der Größe als auch im Restriktionsmuster. Da sich die mtDNA's einer Art in der Regel in beiden Parametern sehr ähnlich sind, liegt die Vermutung nahe, daß die identische Artbezeichnung der Klone MH_4 und DSM zumindest problematisch ist. Eine vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) durchgeführte Artüberprüfung (an Hand von physiologischen Kriterien) bestätigte jedoch zweifelsfrei die entsprechende Artzugehörigkeit.

D. Genetische Untersuchungen

Sowohl P.pinus als auch P.lindnerii sind, wie aus den beschriebenen Voruntersuchungen hervorgeht, selbstfertile Organismen. Um genetische Untersuchungen durchführen zu können, mußten Varianten bzw. Mutanten dieser beiden Hefen hergestellt werden. Alle in dieser Arbeit beschriebenen auxotrophen Mutanten wurden nach UV-Bestrahlung isoliert.

1. Austausch genetischer Information.

a) Charakterisierung der verwendeten auxotrophen Varianten bzw. Mutanten.

Die in Kreuzungsversuchen verwendeten auxotrophen Varianten bzw. Mutanten von P.pinus DSM und P.lindnerii DSM sind in Tab. 18 zusammengefaßt und charakterisiert. Sofern die mutierten Stämme in der Lage waren zu sporulieren, wurden Ascosporen isoliert und die davon erhaltenen auxotrophen Klone als Mutanten bezeichnet.

Stamm	No.	Auxotroph	Reversionsrate	Sporulationsfähigkeit	% Regeneration von Protoplasten auf YS
P.pinus	DSM 70384				
S.1.1		met	1×10^{-4}	+	?
S.1.2		cyt	1×10^{-6}	-	?
S.2.1		pyr	1×10^{-5}	+	?
S.3.1		hyp	1×10^{-4}	-	?
S.4.6(5146)		ade	1×10^{-6} 1×10^{-7}	+	0,4-5,1
S.4.7(5147)		arg	1×10^{-6} 1×10^{-8}	+	0-5,2
5268		ade arg	1×10^{-8}	+	0,6-10,0
P.lindnerii					
DSM	70722				
5221		his	1×10^{-5}	+	?
5222		arg	1×10^{-5}	+	?
5223		ade o.hyp	1×10^{-5}	+	?
5227		cyt	1×10^{-6} 1×10^{-8}	+	0,5-5
5228		ade o.hyp	1×10^{-5}	+	?
5229		ade (pur)	1×10^{-6} 1×10^{-7}	-	1,4-28
P.pinus	MH_4				
36		lys	1×10^{-6}	+	1,0
21		met	1×10^{-5}	-	0,08
6648		lys met	1×10^{-8}	+	0,1-5,2

Tab. 18: Charakterisierung der in Kreuzungsversuchen verwendeten auxotrophen Varianten bzw. Mutanten von P.pinus und P.lindnerii. met=methionin-auxotroph, cyt=cytosin-auxotroph, pyr=pyridoxinauxotroph, hyp=hypoxanthinauxotroph, ade=adeninauxotroph, arg=argininauxotroph, arg=argininauxotroph, his=histidinauxotroph, lys=lysinauxotroph, +=sporulationsfähig, -= nicht sporulierend, ?=nicht untersucht.

b) Rekombination zwischen Stämmen der gleichen Art.

Mit Hilfe von auxotrophen Mutanten sollte versucht werden, ob bei selbstfertilen Hefen, bei denen zumindest teilweise (P.pinus DSM, P.lindnerii) die Induktion des Sexualzyklus offenbar durch Autodiploidisierung erfolgt, durch Zellfusion ein Austausch und damit eine Rekombination ihres genetischen Materials möglich ist. Die Ergebnisse der Kreuzungsversuche sind für jeden der

Stämme im folgenden getrennt dargestellt.

P.pinus MH_4

Die beiden Stämme $MH_4$36 und $MH_4$21 von P.pinus lassen sich gut mit Hilfe der Schachbrett-Methode auf MM-Medium kreuzen. Die auf MM ausgewachsenen Kolonien sporulieren als Ganzes (nicht als Sektor) innerhalb von 4 Tagen. Eine Schwierigkeit der genetischen Analyse bestand in der niedrigen Keimungsrate der Ascosporen. Um für eine Tetradenanalyse geeignetere Stämme zu isolieren (es sollten möglichst alle vier Sporen eines Ascus keimen), wurden Kreuzungen zwischen lysin-auxotrophen und methionin-auxotrophen Stämmen durchgeführt, die Keimungsrate der Ascosporen bestimmt und hieraus besser sporulierende Stämme als die Elternklone miteinander gekreuzt; dieser Vorgang wurde viermal hintereinander durchgeführt, so daß eine Aussage über vier Generationen gemacht werden kann. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 19 zusammengefaßt.

Der Ausgangstamm P.pinus $MH_4$36 zeigt eine Keimungsrate der Sporen von 4,9 %, der Stamm $MH_4$21 allein sporuliert nicht. Diese niedrige Sporkeimungsrate könnte durch ein bzw. mehrere Letalgene oder durch Inversion, Translokationen bzw. durch einen aneuploiden Status der Stämme bedingt sein. Wären Inversionen oder Translokationen verantwortlich für die niedrige Keimungsrate, so sollten die Ascosporen eines Ascus nur mit den Verhältnissen 4:0, 2:2 oder 0:4 in Bezug auf auskeimende und nicht auskeimende Sporen aufspalten (Esser und Kuenen 1967, Mortimer und Hawthorne 1969). Da diese Aufspaltungen für den Stamm $MH_4$36 nicht auftreten, sollte die schlechte Sporenkeimungsfähigkeit dieses Stammes eher durch ein oder mehrere Letalgene bedingt sein oder aber durch einen aneuploiden Zustand. Durch Kreuzungen über mehrere Generationen sollte es im ersten Falle möglich sein, Nachkommen zu selektieren, die durch Rekombination das Letalgen verloren haben.

Wie aus der Tab. 19 hervorgeht, konnte durch Kreuzung der Stämme $MH_4$21 und $MH_4$36 die Sporenkeimungs-

Kreuzung lys x met	isolierte Asci	gekeimte Sporen pro Ascus 4S 3S 2S 1S 0S	% Keimung	Auxotrophie lys met lys pro met	Tetradentyp P R T
Pichia pinus					
$MH_4$36 (geselbstet)	41	0 0 2 4 35	4,9	8 0 0 0	- - -
$MH_4$21 allein nicht sporulationsfähig					
1. Generation	45	0 2 8 16 19	21,9	6 3 6 23	- - -
2. Generation	208	3 17 43 73 72	27,7	21 85 24 93	4 1 10
3. Generation	65	7 19 14 10 15	46,2	29 37 21 36	6 3 16
4. Generation	131	7 19 54 39 13	44,7	22 87 27 91	2 6 17
Rückkreuzung	57	11 16 12 8 10	52,8	25 36 27 36	7 6 14
				103:248:105:279	19:16:57

Tab. 19: Kreuzungen zwischen auxotrophen Mutanten der Stämme $MH_4$36 und $MH_4$21. S=Spore, lys=lysinauxotroph, met=methioninauxotroph, pro= prototroph, lys met= lysinmethionin-doppelt-auxotroph. P= Elterndityp, R= Rekombinationsdityp, T=Tetratyp (P:R:T=1:1:4 mit λ^2 Test auf Übereinstimmung mit den gefundenen Werten überprüft, der P-Wert war > 0,5)

fähigkeit schon bei den Nachkommen (1. Generation) von 4,9 % (geselbstet) auf 21,9 % gesteigert werden. Kreuzungen zwischen diesen Nachkommen ergaben in der zweiten Generation zum Teil eine weitere Steigerung der Sporenkeimungsfähigkeit, die in der dritten Generation bis auf ca.46,2 % erhöht werden konnte. In der vierten Generation nimmt sie dagegen dann wieder ab. (44,7 %). Gleichzeitig war die Zahl der Asci mit vier auskeimenden Ascosporen in der dritten Generation deutlich gesteigert (0 %-10,8 %).
Aus diesen Daten geht hervor, daß die Keimungsfähigkeit der Ascosporen durch Kreuzung und Selektion deutlich gesteigert werden kann, wodurch für Tetradenanalysen geeignetere Stämme isoliert werden können.

Bei der Analyse der Kreuzungsnachkommen (Tab. 19) der Ascosporen aus neunzehn Kreuzungen zwischen lysinauxotrophen und methioninauxotrophen Stämmen ergab sich für die beiden Auxotrophiemarken ein Aufspaltungsverhältnis von 103:248:105:279 für lys:met:lys met: prototroph. Dieses Verhältnis weicht von einer erwarteten Aufspaltung von 1:1 für die Marken Lysinauxotrophie und Methioninauxotrophie ab. Ca. die Hälfte der lysinauxotrophen Nachkommen scheinen letal gewesen zu sein, was für eine Aufspaltung des Letalitätsgens oder der -gene zusammen mit der Lysinauxotrophie spricht.

Eine bei den verschiedenen Kreuzungen durchgeführte Tetradenanalyse für die Auxotrophiemarken ergab, daß, wie für ungeordnete Tetraden erwartet, drei verschiedene Tetradentypen auftraten, nämlich P (= Elterndityp, 2 lys : 2 met), R (= Rekombinationsdityp, 2 lys met : 2 prototroph) und T (= Tetratyp, 1 lys : 1 met : 1 lys met : 1 prototroph). Das Verhältnis zwischen P : T : R betrug 19 : 16 : 57 (ca. 1:1:4). Dieses Verhältnis bedeutet, daß die beiden Gene entweder sehr weit auseinander auf demselben Chromosom liegen und deshalb frei rekombinieren können oder beide Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen. Aus den Kreuzungsergebnissen kann damit nicht entschieden werden, ob die Auxotrophiemarken gekoppelt sind oder nicht.

P.pinus DSM 70384

Von den vom Stamm P.pinus DSM 70384 isolierten auxotrophen Mutanten wurden die Stämme 5146 (adeninauxotroph) und 5147 (argininauxotroph) wegen ihrer relativ niedrigen Reversionsrate (s. Tab. 18) und ihrer guten Sporulationsfähigkeit für die erste Kreuzung (1. Generation, Tab. 20) verwendet. Durch Mischen von Zellen sowie durch Protoplastenfusion der beiden auxotrophen Mutanten konnten auf MM prototrophe, präsumptiv diploide isoliert werden, die als Hybride (Hyb) bezeichnet wurden.

Von diesen präsumptiv diploiden Kolonien sporulierten Hyb. 1, 2, 3, und 4 nur in Sektoren, woraus geschlossen werden kann, daß die Änderung des Ploidiegrades von haploid zu diploid nicht durch Fusion erfolgte, sondern durch Selbstung (Autodiploidisierung). Bei diesen präsumptiv diploiden Kolonien, die auf MM-Medium wuchsen, handelt es sich offenbar um Revertanten, die ein diploides Verhalten vortäuschen. Dagegen sporulierten die Kolonien der Hybride 5, 8 und 9 als gesamte Kolonie, was für diploide Klone typisch ist. Der Auxotrophietest der Ascosporen dieser Prototrophen, die durch Komplementation ihrer Auxotrophiemarken in der Lage sind, auf MM-Medium zu wachsen, ergab, daß beide Auxotrophiemarken der Eltern vorhanden sind. Es handelt sich daher bei diesen präsumptiv diploiden Kolonien (Hyb. 5, 8 und 9) tatsächlich um diploide Klone, die

Stamm		präsumptiv Spontane	analysierte prim.	Zahl der spät.	isol.Ascl	Keimungsrate der Ascosporen (%)	Auxotrophie der Tetratyp					
							ade	lys	ade-arg	pro		
1. Generation												
5146	5147	$1,6X10^{-6}$	Hyb.1		18	77,8	0	0	0	53		
			Hyb.2		61	95,1	3	0	0	193		
			Hyb.3		7	71,4	12	0	0	7		
			Hyb.4		11	100,0	0	0	0	44		
			Hyb.5		33	100,0	23	24	36	33	2	5	26
5146	5147	$2,0X10^{-4}$	Hyb.8		22	100,0	16	18	20	21	1	2	18
			Hyb.9		24	95,8	17	16	23	24	2	6	14
2. Generation												
5218	5157	$1,5X10^{-2}$	Hyb.6		14	100,0	11	11	10	11	3		12
[illegible]		[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]						
Aufspaltungsverhältnis							1	1	1	3	1	1	2

Tab. 20: Zweifaktor-Kreuzung von P.pinus DSM 70384. Rekreuzungen wurden zwei auxotrophe Stämme durch Mischen von Zellen oder durch Protoplastenfusion (mit ● versehen).
1. Generation: Kreuzung von Stamm 5146 und 5147, 2. Generation: Kreuzung von auxotrophen Einsporkulturen, die von isolierten Ascosporen der Fusionsprodukte Hyb.5 abgeleitet sind. P=Parentaldityp, R=Rekombinationsdityp, T=Tetratyp, ade=adeninauxotroph, arg=arginin-auxotroph, pro=prototroph, ade-arg=adenin-arginin-doppelauxotroph, Hyb.=Hybrid, P1=Elter 1 P2= Elter 2

Fusionsprodukte der beiden Ausgangsstämme darstellen. Vor allem der Nachweis von Doppelmutanten (ade arg) in der Nachkommenschaft ist ein klarer Beweis dafür, daß nach der Plasmogamie eine Karyogamie eingetreten ist, wobei es dann während der Meiose zu einer Rekombination der eingebrachten Marker kam. Eine Selbstung (Haplodiploidisierung) kann somit ausgeschlossen werden.

Um für diese Aussage eine weitere Bestätigung zu erhalten, wurden zwei einfach auxotrophe Nachkommen des Hybrides 5 miteinander gekreuzt und eine Reihe von präsumptiv diploiden Klonen dieser zweiten Generation untersucht (siehe Tab. 20). Auch hier konnten wieder Kolonien beobachtet werden, die nur sektorweise sporulierten (wahrscheinlich Revertanten) und solche, bei denen die ganze Kolonie sporulierte. Eine Tetradenanalyse wurde nur bei den letzteren durchgeführt. (siehe Tab. 21). Bei diesen Kreuzungen zeigte sich, daß die Fusionsrate bei dem Mischen von auxotrophen Zellen im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-5} lag, während sie bei Protoplastenfusion im Bereich um 10^{-4} ist. Wie aus Tab. 18 ersichtlich, liegt jedoch die Reversionsrate der auxotrophen Mutanten ebenfalls in diesem Bereich (10^{-5} - 10^{-7}). Daraus ist erklärlich, daß es sich bei den präsumptiv diploiden Kolonien sowohl um Fusionsprodukte als auch um Revertanten handeln kann; eine eindeutige Selektion von Fusionsprodukten auf Grund ihrer Komplementationsfähigkeit ist daher nicht möglich. Bei *L. kluyveri* ist es, wie schon mehrfach nachgewiesen, trotzdem möglich, Fusionsprodukte und Revertanten eindeutig voneinander zu unterscheiden, da erstere nach ca. 7-10 d mit sehr hoher Frequenz sporulieren, letztere frühestens nach 15 d nur in Form von Sektoren.

Aus Tab. 20 ist weiterhin ersichtlich, daß die beiden verwendeten Auxotrophiemarken (ade und arg) nicht miteinander gekoppelt sind. Dies ist zum einen daran ersichtlich, daß in der Nachkommenschaft sowohl die beiden Elterntypen als auch die beiden Rekombinationstypen auftreten, wobei das Verhältnis in etwa 1:1 ist. Zum anderen auch an dem für eine Zweifaktorkreuzung charakteristischen Verhältnis 1:1:4 zwischen Parentaldityp, Rekombinationsdityp und Tetratyp.

P.lindneri DSM 70722

Bei der Kreuzung verschiedener auxotropher Mutanten von P.lindneri DSM 70722 konnten sowohl durch Zellfusion als auch Protoplastenfusion präsumptiv diploide Kolonien nur mit einer sehr geringen Frequenz (ca.10^{-7}) isoliert werden. Diese Frequenz liegt genau in dem Bereich, in dem auch die Reversonsraten der verwendeten Kreuzungspartner liegen. Alle isolierten präsumptiv diploiden Kolonien verhielten sich wie haploide Kolonien, da Sporulation erst nach mehr als 15 d und nur in Sektoren auftrat. Es konnten,wie aus der Tab. 21 ersichtlich, nach Kreuzung zweier auxotropher Mutanten im Auxotrophietest der Ascosporen prototrophe und auxotrophe Sporen mit der Auxotrophie nur eines Kreuzungspartners nachgewiesen werden.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß es bei den Kreuzungen zu keiner Kernfusion gekommen ist und daß die als präsumptiv diploid isolierten prototrophen Kolonien wahrscheinlich haploid sind. Der Verdacht, daß es sich um Revertanten handelt, ist nicht zutreffend, da nach erfolgter Selbstung die Nachkommen solcher Klone genetisch einheitlich sein müssen. Im vorliegenden Fall wären daher Asci zu erwarten, bei denen sämtliche Ascosporen prototroph sind. Als wahrscheinlichere Interpretation bietet sich an, daß es sich bei diesen haploiden prototrophen Klonen, deren Ascosporen nach erfolgter Selbstung eine 2:2 Aufspaltung für Auxotrophie und Prototrophie zeigen, um Transformanten handelt. Sie enthalten im haploiden Zustand neben dem vollständigen Genom eines Elters nur das für die Auxotrophie komplementäre Allel des zweiten Elters. Während der Autodiploidisierung, die durch Endomitose erfolgt, wird das vollständige Genom des einen Elters verdoppelt, während das komplementäre Allel nicht repliziert wird. Nach der Meiose spalten die Ascosporen eines Ascus dann im Verhältnis von 2:2 zwischen auxotroph und prototroph auf (s. Tab. 21). (Entsprechende Ergebnisse bei Rekombination verschiedener Arten siehe weiter auf Seite 95).

Stamm-No. P1	P2	präsumptiv Diploide	Zahl der isolierten Asci	Zahl der ausgekeimten Asci	Auxotrophie der Ascosporen P1	P2	P1P2	pro
5227 cyt	5221 his	$8X10^{-7}$	8	8	0	10	0	13
5227	5222 arg	$1X10^{-7}$						
5227	5223 ade	$1X10^{-7}$	14	14	26	0	0	28
5227	5229 ade	$1X10^{-7}$						
5229	5221	$1X10^{-7}$	9	9	0	12	0	18
5229	5222	$0X10^{-7}$						
5222	5223	$1X10^{-7}$	2	2	0	3	0	3
5222	5221	$3X10^{-7}$	1	1	1	0	0	2
5223	5221	$4X10^{-7}$	14	14	0	22	0	21

Tab 21: Kreuzung zweier auxotropher Mutanten von P.lindnerii durch Mischen von Zellen bzw. durch Protoplastenfusion. P1 und P2= Elternstämme bzw. beim Auxotrophietest, Auxotrophie des Elters P1, P2 oder P1 und P2, ade=adenin-auxotroph, his= histidinauxotroph, arg= argininauxotroph, cyt= cytosinauxotroph, pro= prototroph.

c. Rekombination zwischen Stämmen verschiedener Arten

Zunächst sollte die Kreuzung von auxotrophen Pichia Stämmen verschiedener Arten mit Hilfe der "Schachbrett" sowie mit der "Minimal-Platten" Technik durchgeführt werden. Da dabei jedoch keine Fusionsprodukte isoliert werden konnten, sollten die Kreuzungsversuche durch Protoplastenfusion sowohl mit Hilfe von PEG 6000 als auch durch Elektrofusion wiederholt werden.

Bei Verwendung von PEG 6000 konnten bei Kreuzung der Stämme P.lindnerii 5227 und P.pinus 5159 drei prototrophe Kolonien isoliert werden (s. Tab. 22). Die Tetradenanalyse dieser drei Kolonien ergab eine Aufspaltung von 2:2 zwischen cytosinauxotrophen und prototrophen Ascosporen.

Stämme	präsumptiv Diploide	isolierte Asci	ausgewachsene Asci	Auxotrophie der isolierten Ascosporen			
				P1 cyt	P2 arg	P1P2 cyt arg	proto-troph
P.lindnerii 5227 cyt(P1)		17	17	30	0	0	34
X	3	12	12	24	0	0	21
P.pinus 5159 arg(P2)		22	22	35	0	0	46

Tab. 22: Angegeben sind die Auxotrophietests der Ascosporen-Nachkommen von prototrophen, auf stabilisiertem MM-Platten ausgewachsenen sporulierenden Kolonien zwischen P.lindnerii 5227 (cyt) und P.pinus 5159 (arg) durch Protoplastenfusion mittels PEG 6000.

Neben der physiologischen Marke spaltete bei den Nachkommen dieser Kreuzung zusätzlich ein morphologisches Merkmal, nämlich die Koloniengröße auf. Alle cytosinauxotrophen Kolonien waren dabei im Vergleich zu den prototrophen Kolonien deutlich kleiner.

Da jedoch hier nur eine der Auxotrophiemarken der Kreuzungspartner nachgewiesen werden konnte, die Morphologie der Kolonien (Sporulation erfolgte nach frühestens 15 d in Sektoren) dafür spricht und eine Protoplastenfusion nicht direkt nachgewiesen werden konnte, wurden die isolierten prototrophen Kolonien zunächst als Transformanten angesehen.

Als letzter Versuch zur Kreuzung von Pichia-Stämmen verschiedener Art wurde schließlich die Methode der Protoplastenfusion im elektrischen Feld durchgeführt. Diese Methode hat gegenüber allen anderen den entscheidenden Vorteil, daß man hier den Fusionsvorgang direkt im Mikroskop beobachten kann (Abb.21)

Um bei der Fusion mit möglichst stabilen Stämmen zu arbeiten, wurden die entsprechenden auxotrophen Mutanten zunächst auf supplementiertem MM angezogen. Von sporulierenden Kolonien wurden die Ascosporen isoliert und auf ihre Auxotrophie vor dem Fusionprozeß getestet. Dabei ergab sich, daß bei P.pinus DSM 5268 alle Ascosporen die entsprechenden physiologischen Marken (Adenin und Argininauxotrophie) trugen und die aus den Sporen entstandenden Kolonien eine einheitliche Morphologie aufwiesen. Auch bei dem P.lindnerii Stamm DSM 5227 konnte in allen Sporen die Cytosinauxotrophie nachgewiesen werden. In Gegensatz zu P.pinus jedoch zeigten die aus den isolierten Ascosporen hervorgegangenen Kolonien keine einheitliche Morphologie.

Von 23 Asci, bei denen alle vier Sporen ausgekeimt waren, zeigten 4 Asci eine Aufspaltung von 4:0 zwischen matten kleinen und glänzenden großen Kolonien, 2 Asci eine entsprechende Aufspaltung von 0:4 und 17 Asci eine Aufspaltung von 2:2. Die Morphologieunterschiede ließen sich nur innerhalb von 10 d auf YE, jedoch nicht auf MM beobachten.

> Ein entsprechendes Phänomen wurde bereits bei Einsporkulturen der selbstfertilen homothallischen Hefe Hansenula petersonii von Wickerham (1964) beschrieben. Sie berichtet von glänzenden und matten Kolonien bei diesem Organismus, wobei die glänzenden Kolonien die fermentative Form und die matten Kolonien die oxidative Form sein sollen. Ein Teil der glänzenden Kolonien wandelt sich nach bestimmter Zeit in die matte Form um. Diese Kolonien sind sporulationsfähig. Im Gegensatz dazu bleibt der andere Teil der glänzenden Kolonien auch nach längerer Zeit glänzend und ist nicht sporulationsfähig. Die genetische Grundlage dieses Phänomens ist bisher nicht bekannt.

Bei Kreuzung von Protoplasten der Stämme $MH_4$6648 und DSM 5268 von P.pinus untereinander, sowie zwischen P.lindnerii DSM 5227 und P.pinus DSM 5268 und P. lindnerii DSM 5227 und P.pinus $MH_4$6648 durch Elektrofusion konnten eine Fusion von Protoplasten (Abb.21) mikroskopisch beobachtet werden.

Bei der Kreuzung der P.pinus Stämme $MH_4$6648 und DSM 5268 (Tab.23) konnten auf stabilisierten MM-Platten nur sehr

wenige kleine Kolonien und auf stabilisierten YE Platten sehr viele größere Kolonien beobachtet werden. Die Kolonien von YE Platten vermochten nach Überimpfen auf MM kaum weiterzuwachsen. Aus diesem Grunde war eine weitere Analyse dieser Kreuzung nicht möglich.

Bei Elektrofusion von Protoplasten der Stämme P.lindnerii DSM 5227 und P.pinus DSM 5268 bzw. von P.lindnerii DSM 5227 und P.pinus $MH_4$6648 konnten 110 bzw. 1 präsumptiv diploide Kolonien pro ca. 2 X 10^7 Protoplasten isoliert werden.

Diese prototrophen Kolonien waren alle weiß und sporulierten zunächst nicht. Einige der Kolonien sporulierten dann jedoch nach ca. 14 d Inkubation in Sektoren. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes ergab, daß es sich bei den prototrophen Kolonien nicht um diploide, sondern um haploide handelte.

Die Tetradenanalyse der sporulierenden prototrophen Kolonien ergab die in Tab.24 zusammengefaßten Ergebnisse.

Fusionierte Stämme	präsumptiv Diploide/2X10^7 Protoplasten	Koloniemorphologie und Sporulationsverhalten
P.pinus DSM 5268XMH$_4$6648 (ade arg) (lys met)	0	-
P.lindnerii 5227XMH$_4$6648 (cyt) (met)	1	weiß, matt. sporuliert in Sektoren
P.lindnerii 5227XP.pinus (cyt) DSM 5268	110	meistens weiß.matt, zwei Kolonien von 53 prototroph glänzend, nach 14 d sporulierten 5 Kolonien in Sektoren

Tab. 23: Kreuzung von Protoplasten P.pinus und P.lindnerii durch Elektrofusion.

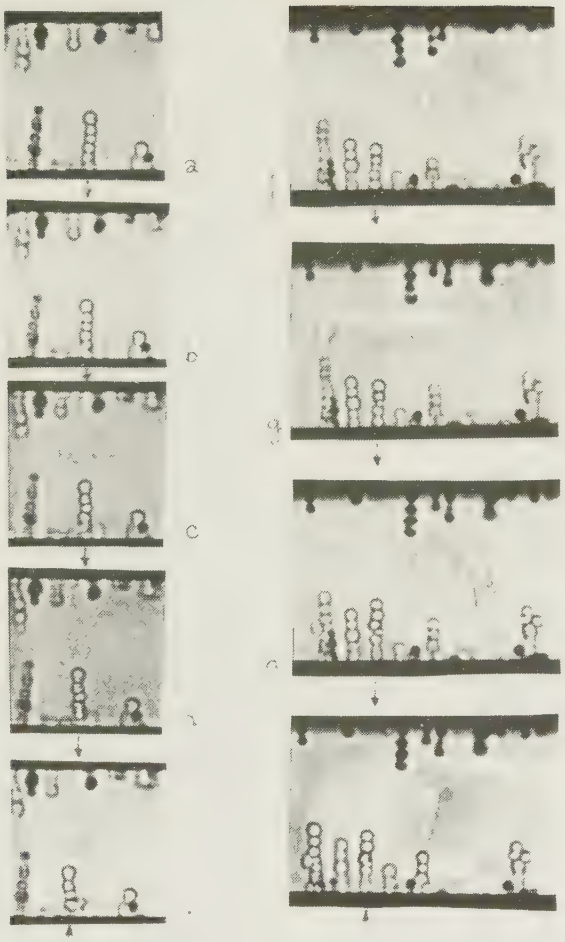


Abb. 21: Mikroskopische Aufnahmen der Protoplastenelektrofusion von P.pinus DSM 5268 und P.pinus MH 6048 nach Mischung der Protoplasten beider Arten. Dargestellt sind verschiedene Stadien der Elektrofusion zweier unabhängiger Versuche. Durch einen Pfeil sind Protoplastenketten markiert, in denen eine Protoplastenfusion beobachtet werden konnte.

Eltern-Stämme P1	P2	Nr.	isolierte Asci	% Sporkeimung	Morphologie glänzend : matt 4:0	2:2	0:4	Auxotrophie P1	P2	P1P2	Relativer DNA-Gehalt/3X10^9 pro. Zellen	
Kreuzung: 1. Generation												
P.lindnerii X	P.pinus	1	39	63,1	4	16	2	42	0	0	57	haploid
(cyt)	(ade arg)	2	73	55,6	1	38	2	97	0	0	92	haploid
Selbstung:2. Generation												
aus Kreuzung ♀	(pro)	3	63	91,7	0	56	2	129	0	0	105	nicht getestet
	(cyt)		51	91,8	0	41	0	187	0	0	0	nicht getestet
aus Selbstung	(pro)	4	17	95,6	3	9	3	24	0	0	41	nicht getestet

Tab.24: Interart-Kreuzungen zwischen P.lindnerii (P1, cytosinauxotroph) und P.pinus (P2 adenin-argininauxotroph); von dieser ersten Generation wurden prototrophe Nachkommen (zweite Generation) geselbstet und dieser Vorgang mit den dabei entstandenen Nachkommen (dritte Generation) wiederholt. Von nicht sporulierenden Bereichen jeweils sporulierender Kulturen erfolgte eine Quantifizierung des DNA-Gehaltes; als Vergleich dienten die entsprechenden Werte von haploiden und diploiden Zellen von S.cerevisiae.
cyt = Cytosinauxotrophie
pro = Prototrophie

Um dem auch bei dieser Interarten-Kreuzung beobachteten Phänomen der 2:2 Aufspaltung (Auxotrophie eines Elters : Prototrophie) auf dem Grund zu gehen, wurde ein Teil der Nachkommen geselbstet (siehe Tab.24, zweite Generation). Dabei stellte sich heraus, daß bei der Selbstung der auxotrophen (Cytosin) Klone die daraus entstehende Nachkommenschaft einheitlich auxotroph ist, wogegen das Kolonieaussehen (matt/glänzend) 2:2 aufspaltet.

Ganz anders verhalten sich dagegen die prototrophen Nachkommen der Kreuzung P.lindnerii X P.pinus. Werden sie geselbstet, so sind ca. 50% der Nachkommenschaft auxotroph (Cytosin), ca. 50% prototroph; das Kolonieaussehen spaltet auch hier 2:2 (siehe Tab.24) auf. Um sicher zu gehen, daß dieser Effekt reproduzierbar ist, wurden prototrophe Nachkommen der zweiten Generation nochmal geselbstet; wie ersichtlich (Tab.24) war auch hier eine 2:2 Aufspaltung (auxotroph : prototroph) zu beobachten. Nur in seltenen Fällen war auch eine 1:3 bzw. 0:4 Aufspaltung festzustellen.

Aufgrund dieses Aufspaltungsverhaltens muß es sich bei den auf MM-Medium isolierten Fusionsprodukten der Kreuzung P.lindnerii X P.pinus tatsächlich um solche gehandelt haben und nicht um Revertanten. Als Folge von Plasmo- und Karyogamie müßt diese prototrophen Fusionsprodukte einen diploiden Karyotyp besitzen. Dagegen spricht allerdings, daß solche Kolonien nur in Sektoren sporulieren (Zeichen für Haploidie). Zusätzlich ergab eine Quantifizierung des DNA-Gehaltes, daß die Zellen solcher Kolonien tatsächlich nur haploid sind. Eine Bestimmung der Schwimmdichte für Kern- und mtDNA zeigte die für P.lindnerii charakteristischen Werte.

Aus diesen Daten muß somit geschlossen werden, daß die prototrophen Kolonien haploid sind und das gesamte Genom von P.lindnerii enthalten.

Wie bei der Intraart-Kreuzung (siehe S.95) schon angedeutet, bietet sich als Erklärung für dieses "anomale" Verhalten die Annahme eines Transformationsereignisses an. Dabei muß postuliert werden, daß die prototrophen Fusionsprodukte (haploid) das auxotrophe Genom von P.lindnerii enthalten (auxotroph für Cytosin) und zusätzlich nur das komplementäre Wildgen (Cyt) des Kreuzungspartners P.pinus.

Die Autodiploidisierung erfolgt nur für den Cromosomensatz eines Kreuzungspartners (P.lindnerii)während das Allel des anderen Partners nicht verdoppelt wird. Erst bei der Meiose II (Äquationsteilung) des auxotrophen Genoms kommt es dann zur Verdoppelung des Wildgens, was in der Folge zu 2 auxotrophen und 2 prototrophen Nachkommen führt, da letztere neben dem auxotrophen Genom auch das frei Wildgen tragen, was die Auxotrophie komplementiert. Solche Prototrophen spalten dann bei erneuter Selbstung wieder, wie gezeigt, 2:2 auf (siehe Abb.22, linkes Schema).

Es erhebtsich nun die Frage, lassen sich auf diese Art und Weise auch solche Fusionsprodukte erklären, deren Nachkommen ausschließlich prototroph sind, oder handelt es sich tatsächlich um Revertanten, wie mehrmals schon darauf hingewiesen. Wie in Abb. 22, rechtes Schema postuliert, wäre dieses Verhalten durch einen Rekombinationsprozeß zwischen dem auxotrophen Genom von P.lindnerii und dem komplementären prototrophen Allel von P.pinus vorstellbar, sodaß ein prototrophes Genom entsteht. Dieses würde nach Autodiploidisierung und Meiose vier prototrophe Nachkommen liefern.

Unter der geschilderten Voraussetzungen müßten die bei der Protoplastenfusion von P.lindnerii und P.pinus erhaltene Prototrophen, deren Nachkommen eine 2:2 Aufspaltung zwischen auxotroph zu prototroph zeigen, als echte Fusionsprodukte aufgefaßt werden, wobei die Bildung der Ascosporen nach dem in Abb. 22 geschilderten Schema verlaufen würde.

2.Genetik der Sektorbildung

Nach Ausstrich und Inkubation von P.pinus und P.lindnerii Zellen auf YE-Medium treten zwei Kolonietypen auf. Einmal handelt es sich dabei um weiße, nicht sporulierende und zum anderen um bräunliche und sporulationsfähige Kulturen. Werden Zellen solcher Kulturen erneut fraktioniert auf YE Agar ausgestrichen, so entstehen einmal zu 99,9-100 % nur weiße , nicht sporulierende Kolonien (beim Ausstrich weißer Kulturen) und im variablen Verhältnis weiße und bräunliche Kolonien (beim Ausstrich bräunlicher Kolonien).

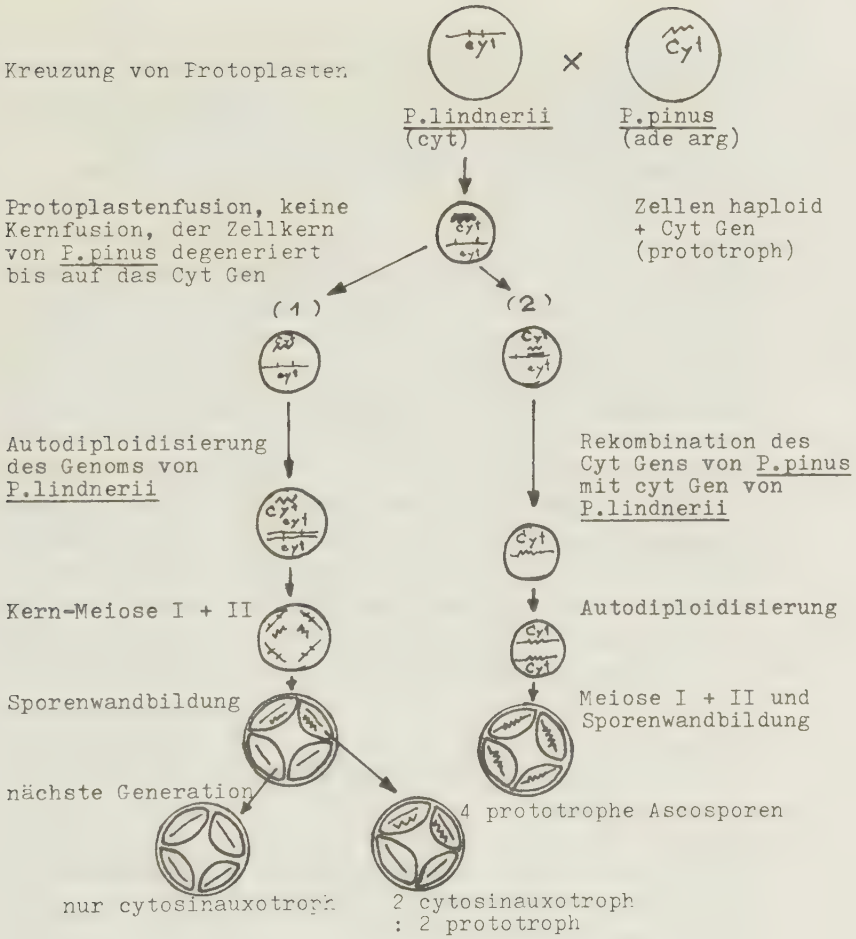


Abb.22: Schema zur Erklärung der 2:2 Aufspaltung zwischen Cytosinauxotrophie bzw. zur Erklärung der 4 prototrophen Ascosporen nach Kreuzung von P.lindnerii (DSM 5227 cyt) und P.pinus (DSM 5268 ade arg)
cyt = cytosinauxotroph
Cyt = Wildtyp Allel
ade = adeninauxotroph
arg = argininauxotroph
— = cyt.
~ = Cyt

Die weißen nicht sporulierenden Kolonien verhalten sich dabei wie Einsporkulturen, indem sie nach längerer Inkubationszeit (15 d) sporulierende Sektoren bilden, während die bräunlichen, sporulierenden Kolonien sich wie Einzellkulturen verhalten, die nach entsprechendend langer Inkubationszeit nichtsporulierende Sektoren bilden.

Um Hinweise über die genetische Kontrolle der Sektorbildung zu erhalten, wurde eine Tetradenanalyse von Einsporkulturen geselbsteter Asci durchgeführt und ihre erneute Sporulationsfähigkeit getestet. Zunächst wurden von verschiedenen P.pinus und P.lindnerii Stämme (siehe Tab.25) alle Ascosporen eines Ascus isoliert und über 30 d bei 25°C auf YE-Medium inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Auswertung makrskopisch, indem zwischen sektorierenden und nichtsektorierenden Einsporkulturen unterschieden wurde. Mikroskopisch ergab sich dabei, daß in den sich durch ihre Farbe (bräunlich) von den sonstigen Kolonie (weiß) unterscheidenden Sektoren Sporulation stattfand.

Bei der Auswertung von Einsporkulturen eines Ascus ergaben sich in Bezug auf die Sektorbildung alle möglichen Aufspaltungen von 4:0 bis 0:4 von sektorierenden zu nichtsektorierenden Kulturen (siehe Tab.25).

Stamm	Zahl der beobachteten Asci	Ascosporen eines Ascus, die nach Selbstung wieder Sporen bilden				
		4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
P.lindnerii DSM 70722	21	0	0	0	0	21
P.lindnerii 5227 (cyt)	21	5	2	11	1	2
P.pinus DSM 70384 (5268) (ade arg)	19	0	0	4	8	7
P.pinus DSM 70384 1.Generation	14	2	8	4	0	0
P.pinus 2.Generation	33	2	12	13	5	2
P.pinus 3.Generation	8	1	0	3	3	1

Tab.25: Tetradenanalyse der Sektorbildung von vollständig ausgewachsenen Asci. Auswertung erfolgte auf YE-Medium nach 30d Inkubation bei 25°C. Bei P.pinus wurden Einsporkulturen von Ascosporen über mehrere Genera-

tionen auf ihre Fähigkeit zur Sektorbildung untersucht. Dabei wurden in der zweiten Generation Einsporkulturen eines Ascus ausgewertet, die aus Sektoren von Einsporkulturen isoliert wurden, die in der ersten Generation eine 4:0 Aufspaltung (alle Einsporkulturen eines Ascus bildeten Sektoren) zeigten. Entsprechendes gilt für die dritte Generation.

Bei P.pinus DSM 70384 wurden Schließlich aus Asci von Einsporkulturen, die aus Ascosporen eines Ascus hervorgegangen waren, von dem alle 4 Einsporkulturen Sektoren bildeten (4:0 Aufspaltung), erneut die vier Ascosporen eines Ascus isoliert, inkubiert und die entstehenden Einsporkulturen (Tab.25, 2.Generation) nach Sektorbildnern und Nichtbildnern unterschieden. Dieses Verfahren wurde wiederholt (Tab.25, 3.Generation). Es zeigte sich dabei, daß stets wieder alle möglichen Aufspaltungen (bis auf Generation 3 die 3:1 Aufspaltung) auftreten und die Sektorbildung offenbar nicht unter der Kontrolle eines Kerngens steht. Vielmehr scheinen möglicherweise auch cytoplasmatische Faktoren an der Kontrolle dieses Phänomens bei den untersuchten Hefestämmen beteiligt zu sein.

3. Genetik der Methanolverwertung

Erste Untersuchungen zur biochemischen Regulation des Methanolstoffwechsels von Hefen wurden vor etwa 15 Jahren durchgeführt (siehe Kap.I-C). In Untersuchungen der letzten fünf Jahre konnten am Methanolstoffwechsel beteiligten Enzyme, sowie hier auftretenden Intermediärprodukte nachgewiesen werden.

Über die genetischen Grundlagen des Methanolstoffwechsels bei Hefen ist dagegen bisher kaum etwas bekannt. Solche Grundlagen sollten mit Hilfe von Methanoldefektmutanten von P.pinus Stamm MH_4 (leicht kreuzbar) durch Kreuzungsexperimente und anschließende Tetradenanalyse erarbeitet werden.

Methanoldefektmutanten wurden nach UV-Mutagenese isoliert. Dabei wurden Klone, die zweimal nach jeweils 7d Inkubation in Methanol-Medium (MM-Medium, dem 5% Methanol v/v zugesetzt ist) nicht, auf YE-Medium jedoch gut wuchsen als Methanoldefektmutaten bezeichnet (die Ausgangstämme wachsen in Methanol-Medium) und für die Kreuzungen verwendet.

Im Verlaufe der Kreuzungen stellte sich jedoch heraus, daß trotz vorher durchgeführten Stammselektion die Ascosporen eines Ascus nur unvollständig auskeimten und damit eine Tetradenanalyse nicht durchführbar war. Aus diesem Grunde erfolgte die genetische Analyse durch Einsporanalyse (siehe Tab.26).

Kreuzung	Zahl der Kreuzung	Zahl der isolierte Asci	Zahl der ausgetes- teten Spo- ren	Wachstum ins Methanol-Medium +	±	-
Mutanten X Verwerter	14	401	286	116 (2 :	57 1 :	45 1)
Mutanten X Mutanten	2	64	117	25 (1 :	36 1 :	52 2)

Tab.26: Einsporanalyse der Methanolverwertung von den Nachkommen aus der Kreuzungen zwischen Mutanten und Methanolverwertern bzw. Mutanten und Mutanten. Die Auswertung des Wachstums auf bzw. ins Methanol-Medium erfolgte am 7.Tag der Inkubation.
+ = Wachstum sehr gut
± = Wachstum mittelmäßig
− = kein Wachstum

Kreuzungen zwischen Methanoldefektmutanten wurden auf Methanolmedium durchgeführt. Es konnten hier keine Rekombinanten (wachsende Kolonien) isoliert werden, was darauf hindeutet, daß die Defektmutationen im gleichen gen oder in der gleichen Komplementationsgruppe liegen, oder daß unter diesen Bedingungen keine Zellfusion stattgefunden hat. Um eine solche Fusion zu erzwingen, wurden deshalb auxotrophe Methanoldefektmutanten untereinander oder auxotrophe Methanoldefektmutanten mit Methanolverwertern auf MM-Medium gekreuzt und es konnten prototrophe (diploide) Fusionsprodukte isoliert werden.

Dabei ergab sich, daß bei Kreuzung von Methanoldefektmutanten miteinander drei verschiedene Kolonietypen, nämlich solche, die in Methanolmedium sehr gut, mittelmäßig oder nicht wachsen auftraten (Tab.26), wobei diese Typen im Verhältnis von ca. 1:1:2 (sehr gut : mittelmäßig : nicht wachsen) aufspalteten. Bei Kreuzung von Methanolverwertern und Methanoldefektmutanten dagegen trat ein Verhältnis von ca. 2:1:1 auf. Bei Beteiligung nur eines Gens sollte jedoch

eine Aufspaltung von 1:1 zwischen nichtwachsenden und wachsenden Kolonien auftreten. Faßt man jedoch die nicht wachsenden und mittelmäßig wachsenden Nachkommen zusammen (Kreuzung von Methanolverwerter und Defektmutanten) ist ein solches Verhältnis gegeben.

Eine solche Zusammenfassung ist jedoch nur möglich, wenn die schwach wachsenden Nachkommen dadurch zustande kämen, daß diese Kulturen aus eine Mischung von Methanolverwertern und Defektmutanten bestünden, also dadurch bedingt wären, daß die verwendeten Methanoldefektmutanten instabil wären.

Aus diesem Grunde sollten die verwendeten Mutanten auf ihre Stabilität hin sowohl auf 1%igem Methanolflüssigmedium als auch auf 5%igem Methanolmedium getestet werden. Die Wachstumsfähigkeit der Mutanten wurde bei Inkubation auf dem Rotationsschüttler bei 25°C über 7d überprüft. Dabei ergaben sich die in Tab.27 zusammengefaßten Ergebnisse.

Stamm	Auxotrophie	Wachstum innerhalb 7d ins 1%igem Methanol-Medium	ins 5%igem Methanolmedium
6683-a	met	+1	0
6681-1	lys	+3	+3
6681-2	lys	C	0
6681-3	lys	+4	+1
6681-4	lys	+4	+3
6681-5	lys	+3	+2
6681-7	lys	+4	C
6681-8	lys	+4	0
6681-9	lys	+1	+1
6681-10	lys	+3	0
6681-11	lys	+1	C
6681-12	lys	+3	0
1	lys	+1	0
3	met	+1	0
2	proto	+2	0
4	met	+2	+2
5	proto	+2	0
7	met	C	0
MH_4 36	lys	+3	+4
MH_4 21	met	+3	+4

Tab.27: Wachstumstest auf Methanol-Medium (1% bzw.5% Methanol v/v) alle Defektmutanten sind von P.pinus MH_4 erhalten worden.
C = kein Wachstum + = Wachstum (Trübung der Kultur
4-3 = sehr trüb , 2-1 = mittelmäßig,

Bis auf zwei Mutante (6681-2) und (7) konnten alle Stämme in 1%igem Methanolmedium sehr gut bis sehr schwach wachsen. In 5%igem Methanolmedium dagegen konnte die Mehrzahl der Defektmutanten zwar nicht wachsen, ein Teil nun jedoch doch, was für eine vermutete Instabilität der Mutante spricht. Daneben spricht das Verhalten verschiedener Mutanten, nämlich die Fähigkeit zum Wachstum auf 1%-igem Methanolmedium und Unfähigkeit auf 5%igem Medium, gegenüber demjenigen anderer Mutanten, die auf beiden Medien nicht wachsen können, für die Beteiligung mindestens zweier Gene der Methanolverwertungsfähigkeit der Stämme. Ein Gen könnte dabei eine gewisse Toleranz von Methanol in Medium kontrollieren, während das zweite die Methanolverwertungs fähigkeit selbst kontrolliert.

So wären Mutanten, die auf 5%igem Methanolmedium nicht, auf 1%igem Medium dagegen wachsen könnten, dadurch charakterisiert, daß das Toleranzgen eine Wachstum zwar auf 1%igem Methanol nicht aber auf 5%igem Methanol zuläßt, während das zweite Gen Methanolverwertung generell ermöglicht. Im Falle der Mutanten, die weder auf 1% Methanol noch auf 5% Methanol wachsen können, ließe dann das Gen für Methanolverwertung kein Wachstum zu. Das Toleranzgen spielt dann keine Rolle mehr.

Die Mutanten 6681-2 und 7 wurden nun, da sie auf den beiden Methanolmedien nicht wuchsen und sich damit bei der Überprüfung als stabile Methanoldefektmutanten erwiesen hatten, erneut untereinander gekreuzt. Innerhalb von 7d entstanden auf diesen Platten prototrophe sporulierende Kolonien. Sechs solche Kolonien wurden in 1%iges bzw. 5%iges Methanolmedium überimpft. Sie zeigten sehr gutes Wachstum auf 1%igem Methanolmedium und vier dieser Kolonien ebenfalls Wachstum auf 5%igem Methanolmedium, während zwei nicht wachsen vermochten.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß an der Regulation des Methanolstoffwechsels mehr als ein Gen beteiligt ist. Die Unregelmäßigkeiten im Phänotyp der präsumptiv diploiden Kolonien (4 von 6 vermögen auf 5% Methanol-Medium zu wachsen) lassen sich entweder dadurch erklären, daß es bei diesen spontan zu einer Herabregulierung zum haploiden Zustand (über aneuploide Stadien) kommt, oder aber daß neben

Kerngenen auch andere (eventuelle zytoplasmatische) Faktoren an der Kontrolle des Methanolstoffwechsels beteiligt sind.

In 28 Einsporkulturen von gekreuzten Ascosporen solcher auf Methanolmedium wachsender prototropher Kulturen, die nach Isolation der Ascosporen von 76 Asci entstanden waren, ergab sich in 1%igem Methanolmedium ein Verhältnis von 10:7:11 und auf 5%igem Methanolmedium von 7:6:15 (ca. 1:1:2) in Bezug auf die Fähigkeit auf diesem Medium zu wachsen. Damit konnte auch nach Selektion von "stabilen" Defektmutanten und ihrer Kreuzung kein anderes Ergebnis als schon anfänglich ohne diese Selektion erzielt werden.

Die in 1% und 5% Methanolmedium sehr gut und mittelmäßig wachsenden Nachkommen der Kreuzungen können als Rekombinationstypen angesehen werden, während die nicht wachsenden Nachkommen Elterntypen sein sollten. Es kann hier jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, daß die verwendeten Defektmutanten weiterhin, auch nach Selektion "stabiler" Mutanten immer noch instabil waren.

Die dargestellten Kreuzungsergebnisse von Methanoldefektmutanten lassen somit keine eindeutige Aussage über die exakte Zahl der Gene, die an der Kontrolle der Methanolverwertungsfähigkeit bei P.pinus MH_4 beteiligt sind, zu.

Stamm	Zahl der isolierten Asci	Sporenkeimung (%)	Zahl der ausgetesteten Sporen	Wachstum in 1% Methanol-Medium			Wachstum in 5% Methanol-Medium		
				4-3,	2-1,	0:	4-3,	2-1,	0
6681 X 7 -2	76	10,2	28	10	7	11	7	6	15

Tab.28: Bestimmung des Wachstums der gekreuzten Methanoldefektmutanten und Einsporkultur Nachkommen der Kreuzung in Methanolmedium mit 1% bzw. 5% Methanol (v/v) bei 25°C 7d auf Rotationsschüttler.
4-3 = Wachstum sehr gut, 2-1 = - mittelmäßig-schwach
C = kein Wachstum

Es sollte sich auf alle Fälle jedoch um mehr als ein Gen handeln und außerdem könnten zytoplasmatische Faktoren eine Rolle spielen.

Papova und Pugovkina (1982) berichten über Kreuzungen mit anschließender Tetradenanalyse von Methanoldefektmutanten des Stammes P.pinus MH4. Sie fanden, daß mindestens 5 Komplementationsgruppen und zytoplasmatische Faktoren an der Regulation des Methanolstoffwechsels beteiligt sind.

IV. Diskussion

Die Ascomyceten Pichia pinus DSM 70384 und Pichia lindnerii DSM 70722 lassen sich mikroskopisch und makroskopisch nicht voneinander unterscheiden und auch die Entwicklungszyklen beider Stämme ähneln sich stark. Beide Organismen sind Haplo-Diplonten, d.h. sie weisen längere haploide und diploide Phasen auf (siehe Entwicklungszyklus s. 76,77).

Das Auftreten von Sektoren sowohl in haploiden als auch in diploiden Kolonien läßt sich in beiden Fällen damit erklären, daß sich der Ploidiegrad der Zellen in diesen Bereichen einer Kolonie von demjenigen der sonstigen Kolonie unterscheidet. Während die Sektoren sonst diploider Kulturen (Einzellkulturen) haploide Zellen enthalten, sind die Sektoren haploider Kolonien (Einsporkulturen) diploid. Die Sektoren in diploiden Kolonien entstehen dabei nach Meiose und Auskeimung der haploiden Ascosporen, während die Diploidisierung in haploiden Einsporkulturen durch folgende Mechanismen zustande kommen könnte:

1. Fusion zwischen genetisch komplementären Zellen (z.B. des Kreuzungstyps a und α bei Saccharomyces cerevisiae, Lindegren und Lindegren 1943, 1944),
2. Fusion zwischen genetisch gleichen Zellen,
3. Autodiploidisierung (Winge und Robert 1958):
   a. Endomitose
   b. Fusion zwischen Mutter- und Tochterzelle (vor der Wandbildung zwischen den beiden Zellen).

In diesem Zusammenhang sollte nicht unerwähnt bleiben, daß eine Korrelation zwischen der Sektorenbildung und dem Auftreten von zusätzlichen DNA-Species neben der nukleären und der mitochondrialen DNA nicht hergestellt werden konnte, da in den untersuchten Stämmen trotz intensiver Suche keine weitere cytoplasmatische DNA gefunden wurde.

Eine solche Korrelation ist bei verschiedenen Organismen beschrieben worden, wie z.B. bei Ascobolus immersus. Verschiedene A.immersus-Stämme sind durch eine sehr hohe Instabilität der Sporenfarbe charakterisiert. Bei einigen der Stämme konnte eine lineare plasmidähnliche DNA isoliert werden, die in Zusammenhang mit der

Instabilität gebracht wurde (Francou 1981). Die genaue Wirkungsweise ist jedoch noch ungeklärt.

Wenn bei P.pinus DSM und P.lindnerii DSM die Diploidisierung durch Fusion zwischen genetisch komplementären Zellen erfolgen würde, dann sollten nach Anwendung der "Massen-Kreuzungs-Technik" zwischen Zellen der aus Ascosporen eines Ascus bzw. mehrerer Asci hervorgegangenen Einsporkulturen innerhalb kurzer Zeit (ca. 7d) viele sporulierende diploide Kolonien beobachtet werden können.

Bei entsprechenden Experimenten konnten bei den obengenannten Pichia-Stämmen keine solchen diploiden Kolonien erhalten werden. Außerdem konnte mikroskopisch keine Fusion zwischen Ascosporen eines Ascus (in situ) sowie keine Fusionsstadien in gekreuzten Kulturen, wie für S.cerevisiae beschrieben (Esser 1976), beobachtet werden.

Diese Daten sprechen dafür, daß die Diploidisierung bei den beiden Pichia-Arten auf andere Weise als bei S.cerevisiae abläuft und daß bei beiden Pichia-Arten keine Kreuzungstypen vorkommen sollten.

Bei S.cerevisiae erfolgt die Fusion zwischen Ascosporen oder Zellen verschiedenen Kreuzungstyps. Bei einem homothallischen Stamm von S.cerevisiae erfolgt sie nach Genkonversion eines Teils der Zellen zwischen konvertierten Zellen und nicht konvertierten Zellen, also auch hier zwischen Zellen verschiedenen Kreuzungstyps (siehe Kap. I-A-3b).

Die zweite Möglichkeit der Diploidisierung ist die Fusion genetisch gleicher Zellen. In Fusionsexperimenten von Protoplasten jeweils einer Einsporkultur von P.pinus (DSM) konnten innerhalb von 7-10 d nach der Fusion als ganze Kolonie sporulierende Kolonien isoliert werden. Somit scheint eine Fusion zwischen genetisch gleichen Zellen nach der Abdauung der Zellwand möglich zu sein, während unbehandelte Zellen gar nicht oder nur sehr selten fusionieren. Die Unfähigkeit der Fusion bei genetisch identischen Zellen könnte demnach auf die Wirkung der Zellwände zurückzuführen sein.

Schließlich kann es durch Autodiploidisierung, die für eine Vielzahl von homothallischen Hefearten beschrieben worden ist (z.B. Hansenula petersonii, Wickerham 1964; Pichia kodamae, van der Walt und Yarrow 1982), zu

einer Verdoppelung des Chromosomensatzes kommen. In Einsporkulturen kann dies durch Endomitose oder aber durch Fusion der Zellkerne noch nicht vollständig voneinander getrennter Mutter- und Tochterzellen (Zellwandbildung zwischen sich teilenden Zellen) erfolgen.

Bei der Endomitose fehlt nach einer Chromosomen-Duplikation die anschließende Kernteilung. Diese Form der Autodiploidisierung ist für Schizosaccharomyces pombe (Leupold 1970) nachgewiesen.

Von einer Fusion zwischen den Kernen noch nicht vollständig voneinander abgeschnürter Mutter- und Tochterzellen in Einsporkulturen von Saccharomycodes ludwigii berichten Yamazaki und Oshima (1979). Während bei dieser Hefe diploide Fusionsprodukte zwischen genetisch unterschiedlichen Zellen des gleichen Kreuzungstyps mit einer Häufigkeit von nur 1×10^{-8} auftraten, bildeten genetisch gleiche haploide Zellen mit einer Frequenz von 5×10^{-3} diploide Kolonien. Diese wiesen bei anschließender Tetradenanalyse Homozygotie für alle genetischen Marken einschließlich des Kreuzungstyps auf.

Die Autoren schließen aufgrund dieser Daten und mikroskopischer Befunde, daß bei S.ludwigii Diploidisierung in haploiden Kulturen durch Fusion von Mutter- und Tochterzellen erfolgt, jedoch lassen die veröffentlichten Daten einen eindeutigen Ausschluß einer Diploidisierung durch Endomitose nicht zu.

Bei P.lindnerii, wo weder durch Zellfusion noch durch Protoplastenfusion verschiedener auxotropher Mutanten diploide Kulturen isoliert werden konnten, scheint ebenfalls Autodiploidisierung zu einer Verdoppelung des Chromosomensatzes zu führen. Die Tatsache, daß bei der Analyse von Tetraden der Fusionsprodukte 2:2-Aufspaltung der Marken nur eines Elters auftraten, legt den Schluß nahe, daß hier nach der Zellfusion zweier Zellen keine Karyogamie erfolgt. Vielmehr scheint der größte Teil des Genoms eines Elters zu degenerieren, während das Genom des anderen Elters vollständig erhalten bleibt. Die Verdoppelung des Chromosomensatzes erfolgt dann durch Autodiploidisierung, wobei zwischen Karyogamie der Kerne von Mutter- und Tochterzellen und Endomitose nicht unterschieden werden kann.

Bei P.pinus dagegen, wo Fusionsprodukte zwischen verschiedenen auxotrophen Mutanten mit einer Häufigkeit von 10^{-5}-10^{-7} erhalten werden, könnte eine Fusion für die Diploidisierung in Einsporkulturen verantwortlich sein. Wenn Autodiploidisierung bei diesem Stamm überhaupt stattfindet, dann sollte ihre Frequenz unter 10^{-4} liegen, da unter 10^{4} ausplattierten haploiden Zellen keine diploiden Kolonien gefunden werden.

Über die genetische Kontrolle von Diploidisierung und Sporulation-im Vordergrund steht hierbei die Frage, wieviele Gene an diesen Vorgängen beteiligt sind und wie die Regulation und Kontrolle der Differenzierungen realisiert wird- kann zur Zeit noch keine Aussage getroffen werden. Die Aufklärung dieser Fragen sollte jedoch, ähnlich wie bei Sordaria macrospora (Esser und Straub 1958), mit Hilfe verschiedener Mutanten möglich sein.

Der P.pinus Stamm $MH_4 36$ zeigt im Gegensatz zu P.pinus DSM einen haplontischen Entwicklungszyklus und ist selbstfertil (Tolstorukov et al. 1977). Außerdem können in Einsporkulturen deutlich Fusionsstadien und Fusionsschläuche beobachtet werden.

Für diesen homothallischen Stamm wurde Diploidisierung in Einsporkulturen durch Fusion individueller komplementärer Zellen, die wie bei S.cerevisiae durch Genkonversion entstehen, beschrieben (Tolstorukov und Benevolensky 1978). Eine entsprechende Diploidisierung kommt beim heterothallischen Stamm $MH_4 21$ normalerweise nicht vor. Nur auf RG-Medium kann bei 30°C mit äußerst niedriger Frequenz (um 10^{-3}-10^{-4}) eine Konversion von a zu α und damit eine Fusion von haploiden Zellen verschiedenen Kreuzungstyps induziert werden (Benevolensky, pers.Mitteilung). Die Fusionsprodukte sporulieren und enthalten Ascosporen vom Kreuzungstyp a und α im Verhältnis von 1:1. Aus diesen Ascosporen isolierte Einsporkulturen sollten mit den komplementären Einsporkulturen von $MH_4 36$ fusionieren, und sporulierende Fusionsprodukte sollten eine 2:2 Aufspaltung der Ascosporen für das Kreuzungstypgen zeigen.

Eine solche Aufspaltung jedoch konnten in entsprechenden Versuchen nicht nachgewiesen werden, wofür

zwei Erklärungen möglich scheinen.

1. Zum einen kann es sein, daß die Stämme $MH_4$36 und $MH_4$21 keine Kreuzungstypen besitzen, sondern jeweils nur ein bzw. mehrere Gene (Fus = Fusion) enthalten, die für eine Zellfusion verantwortlich sind.

Der Stamm $MH_4$21 sollte, da er normalerweise nicht sporuliert, entweder ein aktives Fusionsgen (Fus) und dann zusätzlich ein inaktives Gen für die Regulation der Meiose ($meio^-$) enthalten oder ein inaktives Gen für Fusion (fus) und ein aktives Gen für die Regulation der Meiose (Meio). Im ersten Fall würde es in Einsporkulturen zwar zur Zellfusion kommen, aber zu keiner Sporulation, im zweiten dagegen wäre schon eine Zellfusion blockiert. Dieser Fall scheint beim Stamm $MH_4$21 verwirklicht, da die Einsporkulturen stets haploid sind (Zellvolumen und DNA-Gehalt !).

Der Stamm $MH_4$36 dagegen sollte die aktiven Allele beider Gene (Fus, Meio) enthalten, da es in Einsporkulturen sowohl zur Zellfusion (mikroskopisch konnten Fusionsstadien beobachtet werden) als auch zur Sporulation kommt.

Wenn die Allele Fus bzw. Meio nun über fus bzw. meio dominant sind, werden die Kreuzungsergebnisse zwischen der Einsporkulturen der beiden Stämme erklärbar. In diesem Falle sollte es bei Kreuzung aller möglichen Einsporkulturen eines Ascus zwischen beiden Stämmen in allen Kombinationen zur Fusion zwischen den Kreuzungspartnern kommen. Dies traf für entsprechende Kreuzungsversuche zwischen $MH_4$21 und $MH_4$36 zu. Stets konnten auf MM-Medium prototrophe Kolonien isoliert werden, die gut sporulierten. Bei verschiedenen Kreuzungstypen sollten dagegen nur bei bestimmten Kombinationen Fusionsprodukte (Verhältnis 2:2) isoliert werden können.

2. Andererseits ist es möglich, daß Kreuzungstypen nicht einfach durch Kreuzung von Zellen aus Einsporkulturen nachgewiesen werden können, wenn zum Beispiel Einsporkulturen des homothallischen Stammes $MH_4$36 aufgrund eines starken Kreuzungstypswechsels stets aus einer Mischpopulation von Zellen mit dem Kreuzungstyp a und α bestehen würden. In diesem Falle würde es bei Kreuzung mit Zellen einer Einsporkultur von $MH_4$21, die nur einen Kreuzungstyp enthalten

(entweder a oder α), auch stets zur Zellfusion zwischen Zellen beider Kulturen kommen. Damit wäre der Nachweis vorhandener Kreuzungstypen nicht einfach durch Kreuzung von Zellen solcher Kulturen möglich.

Rekombination bei Kreuzung von Mutanten verschiedener Arten

Bei Fusionsexperimenten von auxotrophen Hefezellen bzw. von Protoplasten konnten keine diploiden, sondern nur haploid prototrophe Fusionsprodukte isoliert werden. Diese Prototrophen enthielten nDNA und mtDNA der Dichte nur eines der beiden Kreuzungspartner. Außerdem konnten bei ihnen nur die Auxotrophiemarke eines Elters nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, daß die entsprechenden haploiden Prototrophen das vollständige Genom eines Kreuzungspartners enthalten und zusätzlich ein zu einer der Auxotrophiemarken komplementäres Wildtypallel des anderen Partners enthalten, das frei oder in ein Chromosom integriert vorliegen kann.

Entsprechende Befunde und Erklärungen sind bei Kreuzungsexperimenten zwischen den folgenden Arten beschrieben:

Aspergillus fumigatus X A.nidulans (Ferenczy et al. 1977)
Schizosaccharomyces pombe X S.octosporus (Sipiczki 1979)
Kluyveromyces lactis X K.fragilis (Whittaker und Leach 1978)
Candida tropicalis X Saccharomycopsis fibuligera (Provost et al. 1978)
Saccharomyces diastaticus X Schizosaccharomyces pombe (Tamaki 1982)

In allen Fällen wurden keine diploiden Fusionsprodukte erhalten und das Gesamtgenom bestand meist aus demjenigen eines Partners und einiger Chromosomen bzw. eines oder mehrerer Gene des anderen Partners.

Probleme der Artabgrenzung bei zwei Stämmen von Pichia pinus

Die Charakterisierung von nukleärer und mtDNA der beiden Stämme DSM und MH_4 von Pichia pinus ergab auffallende Unterschiede im GC-Gehalt. Die mtDNA dieser Stämme unterscheidet sich außerdem deutlich sowohl in ihrer Länge als auch ihren Restriktionsmustern.

Ein solcher Polymorphismus oder eine solche DNA-Divergenz ist für eine Vielzahl von Organismen beschrieben. Dabei ist sowohl ein interspezifischer (zwischen verschiedenen Arten) als auch ein intraspezifischer (bei verschiedenen Stämme einer Art) Polymorphismus bekannt. Interspezifischer mtDNA Polymorphismus ist z.B. bei Paramecium (Cummings 1980), Dekkera/Brettanomyces (McArthur und Clark-Walker 1983) oder Drosophila (Powell 1983) beschrieben. So unterscheiden sich die Nukleotidsequenzen verschiedener Paramecium Arten z.B. zwischen 3,9 und 10,3 %.

Beispiele für intraspezifische Divergenz der mitochondrialen DNA sind in Tab.29 zusammengefaßt.

Organismen	Struktur und Länge der mtDNA	Divergenz: -in der Länge (Kb) -in der Nukleotid (%) -in Restriktionsmuster (Banden)	Referenz
Paramecium aurulia	linear, 44 Kb	1-2%	Cummings 1980
Podospora anserina	zirkulär 95 Kb	5 Banden von 15	Kück 1981
Neurospora crassa	zirkulär 60-73 Kb	Muster sehr ähnlich bis 13 Kb	Collins und Lambowitz 1983
Panulirus argus	zirkulär 16,2 Kb	Muster ca. 50 % unterschiedlich Länge identisch	McLean, et al. 1983
Claviceps purpurea	zirkulär 45 Kb	Muster fast 100% unterschiedlich	Tudzynski et al. 1983
Schizosaccharomyces pombe	zirkulär 17,3-24,4 Kb.	weniger als 1/4 des Musters ähnlich	Wolf 1982
Torulopsis glabrata	zirkulär 18,9 Kb	Längenunterschied: 1,5 Kb Muster 1-2 Banden unterschiedlich	Sriprakash und Batum 1981
Aspergillus nidulans	zirkulär 33 Kb.	Längenunterschied: 13 Kb Muster ähnlich	Earl et al. 1981
Saccharomyces cerevisiae	zirkulär 68-77 Kb	Muster ähnlich Länge bis 9 Kb unterschiedlich	Sanders et al. 1977
Drosophila melanogaster	zirkulär 18 Kb	Muster ähnlich Längenunterschied 1 Kb	Reilly und Thomas 1980

Pyrenomyscus polionotus	zirkulär 15,6 Kb	Muster 1 Bande unterschiedlich	Avise et al. 1979
Homo sapiens	zirkulär 16,5 Kb	C,18 %	Brown 1980
Schaf	zirkulär	C,5-1 %	Upholt und
Ziege	zirkulär 16 Kb	2 %	Dawid 1977

Tab.29: Intraspezifischer mtDNA Polymorphismus.

Als Ursachen des mtDNA Polymorphismus können gelten:

- Verlust von Restriktionsschnittstellen oder Auftreten zusätzlicher Schnittstellen durch Basensubstitutionen (z.B. Homo sapiens, Brown 1980).
- Strikte mütterliche Vererbung (z.B. Schaf und Ziege, Upholt und Dawid 1977).
- Vorkommen von Sequenzinsertionen bzw. -deletionen wie z.B. bei A.nidulans und A.nidulans var. echinulatus (Earl et al. 1981), bei N.crassa, N.intermedia und N. sitophila (Collins und Lambowitz 1983), Drosophila (Fauron und Wolstenholme 1980), Paramecium (Cummings 1980).
- Kodierung für eine unterschiedliche Zahl von mt Proteinen. So wird bei S.cerevisiae, K.lactis und S.lipolytica die Untereinheit 9 des ATPase Gens durch die mtDNA kodiert, beim Menschen dagegen nicht (Wesolowski et al. 1981, Grivell 1983).

In der Regel jedoch zeigen nah verwandte Organismen ähnlichere Restriktionsmuster ihrer mtDNAś als entfernter verwandte (Avise 1979), so daß die Analyse der mtDNA als Kriterium für die Artabgrenzung gelten darf.

Wie McArthur und Clark-Walker (1983) zeigen konnten, kann die Analyse der mtDNA mit Restriktionsenzymen auch für die Hefetaxonomie von besonderer Bedeutung sein. Die Autoren konnten zeigen, daß die imperfekte Art Brettanomyces lambicus ein zu den entsprechenden Mustern von Dekkera bruxellensis und Dekkera intermedia sehr ähnliches Restriktionsmuster der mtDNA aufweist. Dieses Ergebnis spricht deutlich für eine nahe Verwandschaft dieser beiden Gattungen, die beide zu den petite-positiven Hefen zählen.

McArthur und Clark-Walker (1983) untersuchten ebenso verschiedene Arten der Gattung Brettanomyces. Von

sechs Arten zeigten jeweils zwei identische Restriktionsmuster. Da diese außerdem recht ähnliche physiologische Merkmale zeigen, scheint es möglich zu sein, daß B.anomalus und B.clausenii, B.abstinens und B. custersii sowie B. bruxellensis und B.lambicus jeweils nur Stämme einer Art sind.

Betrachtet man nun entsprechende Ergebnisse von Restriktionsanalysen der beiden P.pinus-Stämme DSM und MH_4, so zeigen diese weder in ihren Restriktionsmustern noch in der Länge ihrer mtDNA Homologie. Beide Hefestämme gehören zu den petite-negativen Hefen, und größere Deletionen, die zum Größenunterschied führen könnten, sind nicht denkbar, da sie letal wären. Da beide Stämme selbstfertil sind, kann eine genetische Durchmischung zwischen verschiedenen Stämmen nicht stattfinden. Veränderungen im Restriktionsmuster solcher Stämme müßten somit ausschließlich durch Mutationen erfolgen. Diese könnten jedoch nur schrittweise zu einem stark divergierenden mitochondrialem Genom führen, wobei die Unterschiede in zwei aufeinanderfolgenden Generationen nur geringfügig sein können. Diese Daten entsprechend handelt es sich bei den P.pinus Stämme DSM und MH_4 um verschiedene Hefearten. Zur eindeutigen Klassifizierung der Stämme scheint es jedoch notwendig, weitere P.pinus Stämme verschiedener geographischer Rassen durch Restriktionsanalyse der mtDNAs zu charakterisieren. Nur wenn sich solche Isolate hinsichtlich der Restriktionsmuster ihrer mtDNA in den beiden hier ermittelten Typen von mtDNA zuordnen lassen, kann die Analyse der mtDNA auch in diesem Fall zur Artabgrenzung beitragen. Sollten die Rassen jedoch starke unterschiedliche Muster aufweisen, handelt es sich hier eher um einen intraspezifischen DNA-Polymorphismus, der eine Klassifizierung der Hefen mit Hilfe dieser Methode unmöglich macht.

Neben den unterschiedlichen mitochondrialen Restriktionsmustern sprechen auch die Kreuzungsexperimente dagegen, daß es sich bei P.pinus DSM und MH_4 um zwei Stämme der gleichen Art handelt. Beide Stämme können den Ergebnissen nach nicht miteinander rekombinieren, während Rekombination innerhalb eines Stammes möglich ist. So konnten durch Elektrofusion beider Stämme präsumptiv diploide

Kolonien isoliert werden, die nach Überimpfen auf selektives Medium nach kurzer Zeit nicht mehr weiterwuchsen, obwohl mikroskopisch eine Fusion von Protoplasten beobachtet worden war. Echte diploide Fusionsprodukte zwischen beiden Stämmen konnten niemals isoliert werden. Die Zusammenfassung aller Daten scheint die Schlußfolgerung zu erlauben, das es sich bei den beiden Stämmen DSM und MH_4 eher um Vertreter verschiedener Arten handelt als um solche der gleichen Art.

V. Zusammenfassung

Genetische und zytologische Untersuchungen an methanolverwertenden Stämmen von P.pinus und P.lindnerii lieferten, kurzgefaßt, folgende Ergebnisse:

1. Die Stämme P.pinus DSM und P.lindnerii DSM weisen einen haplo-diplontischen, die Stämme P.pinus MH_4 dagegen einen haplontischen Entwicklungszyklus auf. Für keinen der Stämme konnten Kreuzungstypen nachgewiesen werden. Es handelt sich somit um selbstfertile Monözisten.
2. Die Charakterisierung der Gesamt-DNA ergab, daß sich die nukleäre DNA und die mitochondriale DNA aller verwendeten Stämme (bis auf diejenige der beiden MH_4 Stämme von P.pinus) deutlich im GC-Gehalt voneinander unterscheiden; Die mtDNAs weisen zusätzlich deutliche Unterschiede in ihrer Länge und im Restriktionsmuster auf. Diese Ergebnisse lassen sich als zusätzliche Kriterien für eine Artabgrenzung in der Gattung Pichia verwenden.
3. Der Austausch genetischer Information innerhalb der Stämme P.pinus DSM und P.pinus MH_4 konnte durch Kreuzung auxotropher Mutanten dieser Stämme und anschließender Analyse der Ascosporen nachgewiesen werden. Bei dieser Kreuzungen konnten diploide Fusionsprodukte isoliert werden. Für P.lindnerii konnten solche Fusionsprodukte nicht nachgewiesen werden. Hier erfolgt die genetische Rekombination offenbar durch Transformation.

   Genetische Rekombination zwischen den P.pinus Stämmen MH_4 und DSM konnte nicht nachgewiesen werden. Dies könnte durch eine mögliche Genom-Inkompatibilität bedingt sein, zumal verschiedene Befunde dafür sprechen, daß es sich bei den beiden Stämmen um verschiedene Arten handelt könnte.

   Bei interspezifischen Kreuzungen zwischen P.pinus und P.lindnerii konnten Rekombinanten isoliert werden, die gesamte Genom von P.lindnerii enthielten und zusätzlich einen Teil des Genoms von P.pinus.

VI. Literaturverzeichnis

Aebi, M., Niederberger, P. und Hütter, R. : Isolation of the TRP2 and the TRP3 genes of Saccharomyces cerevisiae by functional complementation in yeast. Curr. Genet. 5, 39-46 (1982)

Allmark, B.M., Morgan, A.J. und Whittaker, P.A. : The use of protoplast fusion in demonstrating chromosomal and mitochondrial inheritance of respiratory-deficiency in Kluyveromyces lactis, a petite-negative yeast. Mol.gen.Genet. 159, 297-299 (1978)

Anné, J. und Peberdy, J.F.: Conditions of induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. Arch. Microbiol. 105, 201-205 (1975)

Anné, J und Peberdy, J.F.: Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethzlene glycol. J. gen. Microbiol. 92, 413-417 (1976)

Anné, J.Eyssen, H.und de Somer, P.: Somatic Hybridisation of Penicillium roquefortii with P.chrysogenum after protoplast fusion.Nature 262,719-721 (1976)

Anné,J. und Eysse, H.: Isolation of inter-species hybrids of Penicillium citrinum and Penicillium cyaneo-fulvum following protoplast fusion. FEMS Microbiol. 4, 87-90 (1978)

Anné, J. und Peberdy, J.F.: Characterisation of interspecific hybrids between Penicillium chrysogenum and P. roquefortii by iso-enzyme analzsis. Trans. Brit. Mycol. Soc., 77, 401-408 (1981)

Anné, J. : Comparison of penicilins produced by interspecies hybrids from Penicillium chrysogenum. Eur.J.Appl. Microbiol. 15, 41-46 (1982 a)

Anné, J.: Genetic evidence for selective chromosomal loss in interspecies hybrids from Penicillium chrysogenum + Penicillium stoloniferum. FEMS Microbiol. 14,191-196 (1982b)

Arima, K. und Takano, I.: Multiple fusion of protoplasts in Saccharomyces yeasts. Mol. gen. Genet. 173, 271-277 (1979)

Arnold, W.N.: Protoplasts. In Yeast Cell Envelops : Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure Vol.II,ed. by Arnold, W.N., CRC Press, Florida, 93-103 (1981)

Asai, Y., Makiguchi, N., Shimada, M.und Kurimura, Y.: New species of methanol assimilating yeasts. J. Gen. Appl. Microbiol. 22,197-202 (1976)

Asthana, H., Humphrey, A.E. und Moritz,V.: Growth of Yeast on methanol as the sole carbon substrate. Biotechnol. Bioengineer. 13, 923-929 (1971)

Avise, J.C., Lansman, R.A. und Shade,R.O.: The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus Pyromyscus. Genetics 92, 279-295 (1979)

Bassel, J. und Mortimer, R.: Genetic analysis of mating-type and alkane utilization in Saccharomyces lipolytica. J. Bacteriol. 114, 894-895 (1973)

Beach, D. und Nurse, P.: High frequency transformation of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Nature 290, 140-142 (1981)

Beach, D., Nurse, P. und Egel, R.: Molecular rearrangement of mating-type genes in fission yeasts. Nature 296, 682-683 (1982)

Becher, D., Conrad, B. und
Böttcher, F.: Genetic transfer mediated by isolated nuclei in Saccharomyces cerevisiae. Curr. Genet. 6, 163-165 (1982)
Beggs, J.D.: Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature 275, 104-109 (1978)
Bennetzen, J.L. und Hall, B.D.: The primary structure of the Saccharomyces cerevisiae gene for alcohol dehydrogenase I. J.biol. Chem. 257, 3018-3025 (1982)
Bicknell, J.N. und Douglass, H.C.: Nucleic acid homologies among species of Saccharomyces. J. Bacteriol. 101, 505-512 (1970)
Binding, H. und Weber, H.J.: The isolation, regeneration and fusion of Phycomyces protoplasts. Mol.gen. Genet. 135, 273-276 (1974)
Blamire, J.: The mating reaction in yeast. II. Spontaneous occurance of omni-mating types. Molec. gen. Genet 141, 189-205 (1975)
Blamire, J. und Melnick, L.M.: The mating reaction in yeast. I. A new mutation involved in the determination of mating type. Molec. gen. Genet 140, 243-252 (1975)
Blanc, H., Gerbaud, C., Slonimski, P.P. und Guerineau, M.: Stable yeast transformation with chimeric plasmids using a 2 µm - circular DNA-less strain as a recipient. Mol. gen. Genet. 176, 335-342 (1979)
Bresch, C., Müller, G. und Egel, R.: Genes involved in meiosis and sporulation of a yeast. Mol.gen. Genet. 102, 301-306 (1968)
Broock de van, M.R.,Sierra,M.,und Figueroa de, L.C.: Ploidy reduction using p-fluorophenylalanine of fusion products of Saccharomyces cerevisiae. Curr. Microbiol.8, 13-16 (1983)
Brown, W.M.: Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 3605-3609 (1980)
Bunn, C.L., Wallace, D.C. und Eisenstadt, J.M.: Cytoplasmic inheritance of chloramphenicol resistance in mouse tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Soi. 71,1681-1685 (1974)
Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62,315-322 (1956)
Bücking - Throm, E., Duntze, W., Hartwell, L.H. und Manney, T.R. : Reversible arrest of haploid yeast cells at the initiation of DNA synthesis by a diffusible sex factor. Exp. Cell. Res. 76,99-110 (1973)
Büschl, R., Ringsdorf, H. und Zimmermann, U.: Electric field-induced fusion of large liposome from natural and polymerizable lipids. FEBS Letters. 150, 38-42 (1982)
Bystrykh, L.V., Sokolov, A.P. und Trotsenko, Y.A.: Purification and properties of dihydroxyacetone synthase from the methylotrophic yeast Candida boidinii. FEBS Letters 132, 324-328 (1981)

Calleja, G.B.,Johnson, B.F. und Yoo, B.Y.: The cell wall as sex organelle in fission yeast: in Sexual Interactions in Eukaryotic Microbes, Academic Press; London, 225-259 (1981)
Case, M.E.,Schweizer, M.,Kushner, S.R. und Giles, N.H.: Efficient transformation of Neurospora crassa by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 5259-5263 (1979)
Chevallier, M.R. und Aigle, M.: Qualitative detection of penicillinase produced by yeast strains carrying chimeric yeast-coli plasmids. FEBS Letters 108, 179-180 (1979)
Christensen, W.B.: Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. J. Bacteriol. 52, 461-466 (1946)
Clarke, L. und Carbon, J.: Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. Nature 287, 504-509 (1980)
Cohen, S.N. und Shapiro, J.A.: Transposable genetic elements. Scientific American. 242 (1980)
Cohen, J.D., Eccleshall, T.R., Needleman, R.B.,Federoff, H.,Buchferer, B.A. und Marmur, J.: Functional expression in yeast of the Escherichia coli plasmid gene coding for chloramphenicol acetyltransferase. Proc.Natl.Acad. Sci. 77, 1078-1082 (1980)
Collins, R.A. und Lambowitz, A.M.: Structural variations and optional introns in the mitochondrial DNAs of Neurospora strains isolated from nature. Plasmid 9, 53-70 (1983)
Colman, A., Byers, M.J., Primrose, S.B. und Lyons, A.: Rapid purification of plasmid DNAs by hydroxyapatite chromatography. Eur. J. Biochem. 91, 303-310 (1978)
Conde, J. und Fink, G.R.: A mutant of Saccharomyces cerevisiae defective for nuclear fusion (yeast/heterokaryon/defective zygote). Proc.Natl.Acad.Sci. 73, 3651-3655 (1976)
Cooney,C.L. und Levine, D.W.: Microbial utilization of methanol. Adv. Appl. Microbiol. 15, 337-365 (1972)
Cooper, T.G.: Tenth international conference on yeast genetics and molecular biology. Current Genetics. 3, 1-4 (1980)
Crabeel, M., Messenguy, F., Lacroute, F. und Glansdorff, N. : Cloning arg 3, the gene for ornithine carbamoyltransferase from Saccharomyces cerevisiae : Expression in Escherichia coli requires secondary mutations; production of plasmid ß-lactamase in yeast. Proc.Natl.Acad. Sci. 78, 5026-5030 (1981)
Crandall, M.A. und Brock, T.D.: Mutual repression of haploid genes in diploid yeast. Nature 219, 533-534 (1968)
Crandall, M. und Caulton, J.H.: Induction of haploid glycoprotein mating factors in diploid yeasts. In Method in Cell Biology, Vol.XII : edited by Presscott, D.M. Academic Press, New York, 185-207 (1975)

Crandall, M., Egel, R. und Mackay, V.L.: Physiology of mating in three yeasts. Adv.Microb. Physiol. 15, 307-398 (1977)
Crandall, M., Lawrence, L.M. und Saunders, R.M.: Molecular complementarity of yeast glycoprotein mating factors. Proc.Natl.Acad.Sci. 71, 26-29 (1974)
Crandall, M. und Iovannisci, D.M.: Genetics of Hansenula wingei. In Current Development in Yeast Research. Advance in Biotechnology. edited by Stewart, G.C. und Russell, I.: Pergamon Press, New York, 149-155 (1981)
Cryer, D.R., Eccleshall, R. und Marmur, J.: Isolation of yeast DNA. In Method in cell biology XII. Prescot D.M. (ed.) Academic Press New York London, 39-44 (1975)
Cummings, D.J. : Evolutionary divergence of mitochondrial DNA from Paramecium aurelia. Mol.gen.Genet.180,77-84 (1980)

Dales,R.B.G. und Croft, J.H.: Protoplast fusion and the isolation of heterokaryons and diploids from vegetatively incompatible strains of Aspergillus nidulans. FEMS 1, 201-204 (1977)
Das, A.: Parasexual hybridization and citric acid production by Aspergillus niger. European J. Appl.Microbiol.9, 117-119 (1980)
Dickson, R.C.: Expression of a foreign eukaryotic gene in Saccharomyces cerevisiae ß-Galactosidase from Kluyveromyces lactis. Gene 10, 347-356 (1980)
Dieckman, C.L., Pape, L.K. und Tzagoloff,A.: Identification and cloning of a yeast nuclear gene (CBP 1)involved in expression of mitochondrial cytochrome b. Proc.Natl. Acad.Sci. 79,1805-1809 (1982)
Diel, F., Held, W., Schlanderer, G. und Dellweg, H.: Comparative investigations on the metabolism of formaldehyde in the presence of ribose-5-phosphate in cell-free extracts of yeast grown on methanol. FEBS Letters 38, 274-276 (1974)
Dimmling, W. und Sambeth, W.: Einzeller-Proteine (Single Cell Protein, SCP)- Ihre Herstellung und Anwendung. forum mikrobiologie 1, 9-18 (1981)
Dobson, M.J., Tuite, M.F., Mellor, J., Roberts, N.A., King, R.M., Burke, D.C., Kingsman, A.J. und Kingsman, S. M.: Expression in Saccharomyces cerevisiae of human interferon - alpha directed by the TRP 1 5'region. Nucleic Acid Research 11, 2287-2302 (1983)
Duntze, W., Mackay, V. und Manney, T.R.: Saccharomyces cerevisiae : A diffusible sex factor. Science 168, 1472-1473 (1970)

Earl, A.J., Turner, G., Croft, J.H., Dales, R.B.G., Lazarus, C.M., Lünsdorf, H. und Küntzel, H. : High frequency transfer of species specific mitochondrial DNA sequences between members of the Aspergillaceae. Curr. Genet. 3, 221-228 (1981)

Egel, R. : The genetic instabilities of the mating type locus in fission yeast. Mol.gen.Genet. 145, 281-286 (1976a)
Egel, R. : Rearrangements at the mating type locus in fission yeast. Mol.gen.Genet. 148, 149-158 (1976b)
Egel, R. : Frequency of mating type switching in homothallic fission yeast. Nature 266, 172-174 (1977a)
Egel, R. : "Flip-Flop" control and transposition of mating genes in fission yeast : in DNA - Insertion Elements, Plasmids and Episomes, ed. by Bukhari, A.I., Shapiro, J. and Adhya, S. : Cold Spring Habor Laboratory, 447-454 (1977b)
Egel, R. : Springende Gene : Schalter in der Gen- Struktur. Biol.uns. Zeit 7, 148-155 (1977c)
Egel, R. : Mating-type switching and mitotic crossing-over at the mating-type locus in fission yeast. Cold Spring Habor Symposia on Quantitative Biology XLV, 1003-1007 (1980)
Egel, R., Kohli, J., Thuriaux, P. und Wolf, K.: Genetics of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Ann.Rev. Genet. 14, 77-108 (1980)
Egel, R. und Gutz, H.: Gene Activation by Copy Transposition in mating-type Switching of a homothallic fission yeast. Curr. Genet. 3, 5-12 (1981)
Esser, K. und Straub, J.: Genetische Untersuchungen an Sordaria macrospora Auersw. Kompensation und Induktion bei genbedingten Entwicklungsdefekten. Zeitschrift für Vererbungslehre 89, 729-746 (1958)
Esser, K. und Kuenen, R.: Genetik der Pilze. Springer - Verlag Berlin 1967
Esser, K. : Kryptogamen : Blaualgen, Algen, Pilze, Flechten, Praktikum und Lehrbuch. Springer - Verlag Berlin Heidelberg (1976)
Esser, K. und Stahl, U.: Cytological and genetic studies of the life cycle of Saccharomycopsis lipolytica. Mol. gen. Genet. 146, 101-106 (1976)
Esser, K. und Stahl, U.: Hybridization. In H.J. Rehm and G. Reed (eds.): Biotechnology. Vol.I: Microbial Fundamentals. Verlag Chemie, Weinheim, 305-329 (1981)
Esser, K. und Lang-Hinrichs, C.: Molecular cloning in heterologous systems. Adv.biochem. Engineering Biotechnol. 26, 143-173 (1983)
Evans, K.O., Adeniji, A. und McClary, D.O.: Selection and fusion of auxotrophic protoplasts of Candida albicans. Antonie van Leeuwenhoek 48, 169-182 (1982)

Fauron, C.M.-R. und Wolstenholme, D.R.: Extensive diversity among Drosophila species with respect to nucleotide sequences within the adenine + thymine rich region of mitochondrial DNA molecules. Nucleic Acids Research. 8, 2439-2452 (1980)
Federoff, H.J., Cohen, J.D., Eccleshall, T.R., Needleman, R.B., Buchferer, B.A., Giacalone, J. und Marmur, J.: Isolation of a maltase structural gene from Saccharomyces carlbergensis. J. Bacteriol. 149, 1064-1070 (1982)

Ferenczy, L., Kevei, F. und Zsolt, J.: Fusion of Fungal protoplasts. Nature 248, 793-794 (1974)
Ferenczy, L., Kevei, F. und Szegedi, M.: High frequency fusion of fungal protoplasts. Experientia 31, 1028-1030 (1975)
Ferenczy, L., Szegedi, M. und Kevei, F.: Interspecific protoplast fusion and complementation in Aspergilli. Experientia 33, 184-186 (1976)
Ferenczy, L., Kevei, F. und Szegedi, M.: Fusion of fungal protoplasts induced by polyethylene glycol. In : Microbial and Plant Protoplasts : J.F. Peberdy, A.H. Rose, H.J. Rogers und E.C. Cocking (eds.). Academic Press New York, London, 177-187 (1976)
Ferenczy, L., Szegedi, M., Kevei, F.: Interspecific protoplast fusion and complementation in Aspergilli. Experientia 33, 184-185 (1977)
Ferenczy, L. und Maraz, A.: Transfer of mitochondria by protoplast fusion in Saccharomyces cerevisiae. Nature 268, 524-525 (1977)
Fincham, J.R.S. und Day, P.R., Radford, A.: Fungal genetics. Blackwell Scientific Publications Oxford, U.K. (1979)
Fonty, G., Goursot, R., Wilkie, D. und Bernardi, G.: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. J.Mol. Biol. 119, 213-235 (1978)
Fournier, P.,Provost, A.,Bourguignon, C. und Heslot, H.: Recombination after protoplast fusion in the yeast Candida tropicalis. Arch. Microbiol. 115,143-149 (1977)
Fowell, R.R. : Sporulation and hybridization of yeasts. In The Yeasts edited by A.H. Rose und J.S. Harrison. Vol.I, Academic Press,London, 303-385 (1969)
Fowke, L.C., Rennie, P.J., Kirkpatrick, J.W. und Constabel, F.: Ultrastructural characteristics of intergeneric protoplast fusion. Can.J.Bot. 53, 272-278 (1975)
Francou, F.: Isolation and characterization of a linear DNA molecule in the fungus Ascobolus immersus. Mol. gen. Genet. 184, 440-444 (1981)
Frehel, C., Lheritier, A., Sanchez-Rivas, C. und Schaeffer, P.: Electron microscopic study of Bacillus subtilis protoplast fusion. J.Bacteriol. 137, 1354-1361 (1979)
Fujii, T. und Tonomura, K.: Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by a Candida species. Agr.Biol. Chem. 36, 2297-2306 (1972)
Fujii, T. und Tonomura, K.: Hexose - phosphate as an intermediate in the assimilation of methanol by Candida species. Agr.Biol.Chem. 37, 447-449 (1973)
Fujii, T., Asada, Y. und Tonomura, K. : Assimilative pathway of methanol in Candida sp. Incorporation of ^{14}C-methanol, ^{14}C-formaldehyde, ^{14}C-formate and ^{14}C-bicarbonate into cell constituents. Agr.Biol.Chem. 38,1121-1127 (1974)
Fujii, T. und Tonomura, K.: Incorporation of ^{14}C-formaldehyde into hexose phosphate by cell free extract of a methanol-utilizing yeast, Candida sp. Agr.Biol.Chem. 38, 1763-1765 (1974)
Fujii, T. und Tonomura, K.: Oxidation of methanol and formaldehyde by a system containing alcohol oxidase and catalase purified from Candida sp. N-16. Agr.Biol. Chem. 39, 2325-2330 (1975)

Fukuda, H. und Kimura, A. : Transfer of mitochondria into protoplasts of Saccharomyces cerevisiae by mini-protoplast fusion. FEBS Letters 113, 58-60 (1980)
Fukui, S., Tanaka, A.,Kawamoto, S., Yasuhara, S.,Teranishi, Y. und Osumi, M.: Ultrastructure of methanol-utilizing yeast cells : Appearance of Microbodies in Relation to high catalase activity. J.Bacteriol. 123, 317-328 (1975)

Gaillardin, C.M., Charoy, V. und Heslot, H.: A study of copulation, sporulation and meiotic segregation in Candida lipolytica. Arch.Mikrobiol.92,69-83 (1973)
Galeotti, C.L., Sriprakash, K.S., Batum, C.M. und Clark-Walker, G.D. : An unexpected response of Torulopsis glabrata fusion products to x-irradiation. Mut.Res.81, 155-164 (1981)
Gasson, M.J. : Production, regeneration and fusion of protoplasts in lactic Streptococci. FEMS 9, 99-102 (1980)
Genthner, F.J. und Borgia, P.T.: Spheroplast fusion and heterokaryon formation in Mucor racemosus. J.Bacteriol. 134, 349-352 (1978)
Gerbaud, C., Elmerich, C., Tandeau de Marsac, N., Chocat, P., Charpin, N., Guefineau, M. und Aubert, J.P.: Construction of new yeast vectors and cloning of the nif (Nitrogen Fixation) gene cluster of Klebsiella pneumonia in yeast. Curr.Genet. 3, 173-180 (1981)
Gerlach, W.L.: Sporulation in mating type homozygotes of Saccharomyces cerevisiae. Heredity 32(2), 241-249 (1974)
Goodey, A.R. und Bevan, E.A.: Production and genetic analysis of yeast cybrids. Curr. Genet. 7,69-72 (1983)
Gorin, P.A.J. und Spencer, J.F.T.: Proton magnatic resonance spectroscopy an aid in identification and chemotaxonomy of yeasts. Advances in applied microbiology.13, 25-89 (1970)
Gregoriadis, G.: Recent progress in liposome research. In G. Gregoriadis and A.C. Allison (eds.): Liposomes in biological systems. John Wiley & Sons Ltd. 377-397 (1980)
Grivell, L.A.: Die DNA der Mitochondrien. Spektrum der Wissenschaft (Mai), 72-87 (1983)
Groves, D.P. und Oliver, S.G.: Formation of Intergeneric Hybrids of yeasts by Protoplast Fusion. Mont.Abstract France s.123 (1982)
Gunge, N. und Sakaguchi, K.: Fusion of mitochondria with protoplasts in Saccharomyces cerevisiae. Mol.gen.Genet. 170, 243-247 (1979)
Gunge, N. und Tamaru, A.: Genetic analysis of products of protoplast fusion in Saccharomyces cerevisiae. Japan.J. Genet. 53, 41-49 (1978)
Gutz, H. : "Twin Meiosis" and other ambivalences in the life cycle of Schizosaccharomyces pombe. Science 158, 795-798 (1967)
Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U. und Loprieno, N.: Schizosaccharomyces : In Handbook of Genetics Vol.I.,R.C. King (ed.), Plenum Press New York, London, 395-446 (1974)
Gutz, H. und Doe, F.J.: Two different to mating-types in Schizosaccharomyces pombe. Genetics.74, 563-569 (1973)

Haber, J.E., Savage, W.T., Raposa, S.M., Weiffenbach, B. und Rowe, L.B.: Mutations preventing transpositions of yeast mating-type alleles. Proc.Natl.Acad.Sci. Vol. 77, 2824-2828 (1980)
Haber, J.E., Mascioli, D.W. und Rogers, D.T.: Illegal transposition of mating-type genes in yeast. Cell. 20, 519-528 (1980)
Haber, J.E. und Garvik, B.: A new gene affecting the efficiency of mating-type interconversions in homothallic strains of Saccharomyces cerevisiae. Genetics. 87, 33-50 (1977)
Halfmann, H.J., Röcken, W., Emeis, C.C. und Zimmermann, U.: Transfer of mitochondrial function into a cytoplasmic respiratory-deficient mutant of Saccharomyces yeast by electro-fusion. Curr.Genet.6, 25-28 (1982)
Halfmann, H.J., Emeis, C.C. und Zimmermann, U.: Electrofusion of haploid Saccharomyces yeast cells of identical mating-type. Arch.Microbiol. 134, 1-4 (1983)
Hamyln, P.F. und Ball, C.: Recombination studies with Cephalosporium acremonium. In: Genetics of industrial microorganisms. (Sebek, O.K., Laskin, A.,eds.). American Society for Microbiology, Madison. 185-191 (1979)
Harashima, S.,Nogi,Y. und Oshima, Y.: The Genetic System Controlling Homothallism in Saccharomyces Yeasts. Genetics 77, 639-650 (1974)
Harashima, S. und Oshima, Y.: Mapping of the homothallic genes, HMα And HMa, in Saccharomyces yeast. Genetics. 84, 437-451 (1976)
Hazeu, W.,Bruyn, J.C. und Bos, P.: Methanolassimilation by yeasts. Arch. Mikrobiol. 87, 185-188 (1972)
Hennikoff, S., Tatchell, K., Hall, B.D., Nasmyth,K. : Nature 289, 33-37 (1981)
Herman, A.I.: Mating responses in Candida lipolytica. J. Bacteriol. 107, 371 (1971)
Herman, A. und Roman, H.: Allele specific Determinants of homothallism in Saccharomyces lactis. Genetics 53, 727-740 (1966)
Hicks, J.B. und Herskowitz, I.: Interconversion of yeast mating types I. Direct observations of the action of the homothallism gene (HO). Genetics 83, 245-258 (1976)
Hicks, J.B., Strathern, J.N. und Herskowitz, I.: The Cassette Model of mating-type interconversion: In "DNA Insertionelements, plasmids and Episomes. edited by A. Bukhari, J.Shapiro und S.Adhya: Cold Spring Habor Lab., New York, 457-462 (1977)
Hicks, J., Strathern, J.N. und Klar, A.J.S. : Transposable mating type genes in Saccharomyces cerevisiae. Nature 282,(1979)
Hinnen, A., Hicks, J.B. und Fink, G.R.: Transformation of yeasts. Proc.Natl.Acad.Sci. 75, 1929-1933 (1978)
Hitzeman, R.A., Hagie, F.E., Levine, H.L., Goeddel, D.V., Ammerer,G. und Hall, B.D. : Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature 293, 717-722 (1981)
Hitzeman,R.A., Leung, D.W., Perry,L.J., Kohr, W.J., Levine, H.L. und Goeddel, D.V. : Secretion of human interferons by yeast. Science 219, 620-625 (1983)
Hollenberg, C.P. : The expression of bacterial antibiotic resistence genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. In plasmids of medical, environmental and commercial importance. edited by K.N. Timmis, and A. Pühler: Elsevier North-Holland Biomedical Press, 481-492 (1979)

Holzschu, D.L., Tredick, J., und Phaff, H.J. : Validation of the yeast Sporidiobolus ruinenii based on its deoxyribonucleic acid relatedness to other species of the genus Sporidiobolus. Curr. Microbiol. 5, 73-76 (1981)
Hopper, A.K. und Hall, B.D. : Mutation of a heterothallic strain to homothallism. Genetics 80, 77-85 (1975)
Hopper, A.K. und Hall, B.D. : Mating type and sporulation in yeast I. Mutations which alter mating type control over sporulation. Genetics 80, 41-59 (1975)
Hughes, B.G., White, F.G. und Smith, M.A. : Fate of bacterial plasmid and during uptake by barley protoplasts. FEBS Letters 79, 80-84 (1977)

Isaac,S. und Peberdy, J.F. : Production of mycolytic enzymes. In Protoplast-Applications in Microbial Genetics. A Handbook of experimental Methods, J.F. Peberdy (ed.) U. of Nottingham, 12-16 (1979)
Ivy, J., Hicks, J., Haars, L. Strathern, J., Nasmyth, K. und Klar, A. : SIR/MAR regulation of the unexpressed mating type cassettes. (Abstract) 11.International Conference on Genetics and Molekular Biology, Montpellier, France, p.135 (1982)

Jara, P., Allais, J.J. und Baratti, J. : Isolation and characterization of a methanol-utilizing yeast with high cell yield. Eur.J.Appl.Microbiol.Biothechnol. 17, 19-23 (1983)
Jimenez, A. und Davies, J. : Expression of transposable antibiotic resistance element in Saccharomyces. Nature 287, 869-871 (1980)
Johannsen, E. und van der Walt, J.P. : Interfertility as Basis for the delimitation of Kluyveromyces marxianus. Arch.Microbiol. 118, 45-48 (1978)
Johnston, J.R. und Mortimer, R.K. : Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. J. Bacteriol.78, 292 (1959)

Kao, K.N. und Michayluk, M.R. : A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta 115, 355-367 (1974)
Kassir, Y. und Simchen, G. : Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating type region. Genetics 82, 187-206 (1976)
Kato, N., Omori, Y. Tani, Y. und Ogata, K.: Alcohol oxidase of Kloeckera sp. and Hansenula polymorpha. Catalytic properties and subunit structures. Eur.J.Biochem. 64, 341-350 (1982)
Kato, N., Tani, Y. und Ogata, K. : Enzym system for methanol oxidation in yeasts. Agr. Biol. Chem. 38, 675-677 (1974)
Kato, N., Higuchi, T., Sakazawa, C., Nishizawa, T., Tani, Y. und Yamada, H. : Purification and properties of a transketolase responsible for formaldehyde fixation in a methanol-utilizing yeast, Candida boidinii (Kloeckera spec.) No. 2201. Biochemi.Biophys.Acta 715, 143-150 (1982)
Kato, N., Tamaoki, T., Tani, Y. und Ogata, K. : Purification and characterization of formaldehyde dehydrogenase in a methanol-utilizing yeast, Kloeckera sp.No.2201. Agr.Biol.Chem. 36, 2411-2419 (1972)
Kato, K., Kurimura, Y., Makiguchi, N. und Asai, Y. : Determination of methanol strongly assimilating yeasts. J.gen. Appl.Microbiol. 20, 123-127 (1974 b)

Käufer, N.F., Fried, H.M., Schwindinger, W.F., Jasin, M. und Warner, J.R. : Cycloheximide resistance in yeast : the gene and its protein. Nucleic Acids Research 11, 3123-3135 (1983)
Kevei, F. und Peberdy, J.F. : Interspecific hybridization between Aspergillus nidulans and Aspergillus rugulosus by fusion of somatic protoplasts. J.gen.Microbiol. 102, 255-262 (1977)
Kevei, F. und Peberdy, J.F.: Induced segregation in interspecific hybrids of Aspergillus nidulans and A.rugolosus obtained by protoplast fusion. Mol.gen.Genet. 170, 213-218 (1979)
Klar, A.J.S., Fogel, S. und MacLeod, K. : MAR 1-A regulator of the HMa and HMα Loci in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 93, 37-50 (1979)
Klar, A.J.S., Fogel, S. und Radin, D.N.: Switching of a mating-type a mutant allele in budding yeast Saccharomyces cerevisiae. Genetics 92, 759-776 (1979)
Klar, A.J.S., Fogel, S. und Lusnak, K.: Gene conversion of the mating-type locus in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 92, 777-782 (1979)
Klar, A.J.S., Strathern, J.N., Broach, J.R. und Hicks, J.B.: Regulation of transcription in expressed and unexpressed mating-type cassettes of yeast. Nature, vol.289 (1981)
Kohli, J., Hotinger, H., Munz, P., Strauss, A. und Thuriaus, P.: Genetic mapping in Sch. pombe by mitotic and meiotic analysis and induced haploidization. Genetics 87, 471-489 (1977)
Kopecka, M., Gabriel, M. und Nečas, O.: A method of isolating anucleated yeast protoplasts unable to synthesize the glucan fibrillar component of the wall. J.gen. Microbiol. 81, 111-120 (1974)
Kosikov, K.V. und Medvedeva, A.A. : Isolation of hybrids of Schizosaccharomyces pombe and Octosporomyces japonicus. Microbiology 46, 61-64 (1977)
Kucsera, J. und Ferenczy, L.: Interspecific protoplast fusion between Candida albicans and Candida tropicalis. (Abstract) 5. International Protoplast Symposium, p.52 Szeged (Ungarn) 1979
Kurtzman, C.P., Johnson, C.P. und Smiley, M.J.: Determination of Conspecificity of Candida utilis und Hansenula jadinii through DNA-Reassociation. Mycologia 71, 844-847 (1979)
Kushner, P.J., Blair, L.C. und Herskowitz, I.: Control of yeast cell types by mobile genes: A test. Proc.Natl.Acad. Sci. 76, 5264-5268 (1979)
Kück, U.: Struktur und Funktion mitochondrialer DNA bei Pilzen. Dissertation. Abteilung für Biologie, Ruhr-Universitat Bochum (1981)

Lancashire, W.E. und Matoon, J.R.: Cytoduction: A tool for mitochondrial genetic studies in yeast. Mol.gen. Genet. 170, 333-344 (1979)

Lee, J.D. und Komagata, K.: Taxonomic study of methanol assimilating yeasts. J.Gen.Appl. Microbiol. 26, 133-158 (1980)
Lee, J.D. und Komagata, K.: Pichia cellobiosa, Candida cariosilignicola and Candida succiphila, New species of methanol - assimilating yeasts. Int .J.Syst.Bacteriol.30, 514-519 (1980 b)
Lemke, P.A., Ellison, J.R., Marino, R., Morimoto, B., Arons, E. und Kohman, P.: Fluorescent feulgen staining of fungal nuclei. Exptl. Cell Res. 96, 367-373 (1975)
Leth Bak, A. und Stenderup, A.: Deoxyribonucleic Acid Homology in yeasts. Genetic relatedness within the Genus Candida. J. gen. Microbiol. 59, 21-30 (1969)
Leupold, U. : Studies on recombination in Schizosaccharomyces pombe. Cold Spring Habor Symposia on Quantitative Biology 23, 161-170 (1958)
Leupold, U.: Transposable mating-type genes in yeast. Nature. 283 (1980)
Levine, D.W. und Cooney, C.L. : Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. Appl. Microbiol. 26, 982-990 (1973)
Lindegren, C.C. und Lindegren, G.: A new method of hybridizing yeast. Proc.Natl.Acad.Sci. 29, 306-308 (1943)
Lindegren, C.C. und Lindegren, G.: Instability of the mating type alleles in Saccharomyces. Ann.Miss.Bot.Gard. 31, 203-217 (1944)
Lodder, J.: The yeasts. North-Holland Publishing Company Amsterdam (1970)
Losson, R. und Lacroute, F.: Cloaning of a eukaryotic regulatory gene. Mol.gen. Gen. 184, 394-399 (1981)
Lederberg, J. und Lederberg, E.M.: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63, 399-406 (1952)
Lückermann, G., Sipicski, M. und Wolf, K.: Transmission, segregation, and recombination of mitochondrial genomes in zygote clones and protoplast fusion clones of yeast. Mol.gen. Genet. 177, 185-187 (1979)
Lurquin, P.F. und Kado, C.I.: Escherichia coli plasmid pBR 322 Insertion into plant protoplasts and into their nuclei. Mol.gen.Genet. 154, 113-121 (1977)
Lurquin, P.F. : Entrapment of plasmid DNA by liposomes and their interactions with plant protoplasts. Nucleic Acids Research 6, 3773-3784 (1979)

Magee, W.E.: Liposomes as carriers of polynucleotides. In G. Gregoriadis and A.C. Allison (eds.) Liposomes in biological systems. John Wiley and Sons, Ltd., 249-263 (1980)
Mackay, V und Manney, T.R.: Mutations affecting sexual conjugation and related processes in Saccharomyces cerevisiae. I. Isolation and Phenotypic Characterization of nonmating Mutants. II. Genetic Analysis of nonmating Mutants. Genetics 76, 255-288 (1974)
Malone, R.E. und Esposito, R.E.: The RAD52 gene is required for homothallic interconversion of mating types and spontaneous mitotic recombination in yeast. Proc.Natl. Acad.Sci. Vol.77, 503-507 (1980)

Malone, R.E. : Interaction between the Mat a locus and the rad 52-1 mutation during homothallic switching in yeast. (Abstract) 11. International Conference on Genetics and Molecular Biology, Montpellier, France. 134 (1982)
Maraź, A. und Subik, J. : Transmission and recombination of mitochondrial genes in Saccharomyces cerevisiae after protoplast fusion. Mol.gen.Genet. 181, 131-133 (1981)
Maraz, A. und Ferenczy, L. : Selective transfer of fungal cytoplasmic genetic elements by protoplast fusion. Curr. Microbiol. 4, 343-345 (1980)
Margoliash, E. und Schejter, A. : Advances in protein chemistry : Anfinsen, Jr..C.B., Anson, M.L., Edsall, J.T. und Richards, F.M. (edt.) 21, Academic Press, 114-271 (1966)
Marmur, J., Falkow, S. und Mandel, M. : New approaches to bacterial taxonomy. Ann.Rev. of Microbiol. 17, 329-372 (1963)
Martini, A. Phaff, H.J. und Douglass, S.A. : Deoxyribonucleic acid base composition of species in the yeast genus Kluyveromyces van der Walt Emend. Van der Walt. Bacteriol. 111, 481-487 (1972)
Mascioli, D.W. und Haber, J.E. : A cis acting mutation within the Mat a locus of Saccharomyces cerevisiae that prevents efficient homothallic mating-type switching. Genetics 94, 341-360 (1980)
McArthur, C.R. und Clark-Walker, G.D. : Mitochondrial DNA size diversity in the Dekkera/Brettanomyces yeasts. Curr. Genet. 7, 29-35 (1983)
McDonell, M.W., Simon, M.N. und Studier, F.W. : Analysis of restriktion fragments of T 7 DNA and determination of molekular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J.Mol.Biol. 110, 119-146 (1977)
McLean, M., Okubo, C.K. und Tracey, M.L. : mt DNA heterogeneity in Panulirus argus. Experientia 39, 536-538 (1983)
Meade, J.H. und Gutz, H. : Mating type mutations in Schizosaccharomyces pombe: Isolation of mutants and analysis of strains with an h⁻ or h+ phenotype. Genetics 83, 259-273 (1976)
Mercereau-Puijalon, O., Lacroute, F. und Kourilsky, P. : Synthesis of a chicken ovalbumin-like protein in the yeast Saccharomyces cerevisae. Gene 11, 163-167 (1980)
Meyer, S.A., Anderson, K., Brown, R.E., Smith, M. Th., Yarrow, D., Mitchell, G. und Ahearn, D.G. : Physiological and DNA-characterisierung of Candida maltosa a Hydrocarbon-utilizing yeast. Microbiol. 104, 225-231 (1975)
Middelhoven, W.J., Braekhuizen, B. und van Eijk, J. : Detection, with the dye Phloxine, of yeast mutants unable to utilize nitrogenous substances as the sole nitrogen. J. Bacteriol. 128, 851-852 (1976
Miller, M.W., Phaff, H.J., Miranda, M., Heed, W.B. und Starmer, W.T.: International J. of Systematic Bacteriol.26, 88-91 (1976)
Morgan, A.J., Brunner, A. und Whittaker, P.A. : Protoplast fusion in a petite-negative yeast, Kluyveromyces lactis. Curr. Genet. 2, 87-93 (1980)
Mortimer, R.K. und Hawthorne, D.C. : Yeast genetics In the Yeasts edited by A.H. Rose und J.S. Harrison. Vol.I Academic Press, London, 386-460 (1969)

Murray, K. und Murray, N.E. : Phage Lamda receptor chromosomes for DNA fragments made with restriktion endonuclease III of Haemophilus influenzae and restriktion endonuclease I of Escherichia coli. J.Mol.Biol. 98, 551-564 (1975)

Nakase, T. und Komagata, K. : DNA base composition of the genus Hansenula .J.gen.Appl.Microbiol. 15, 85-95 (1969)
Nakase, T. und Komagata, K. : Furthur investigation on the DNA base composition of the genus Hansenula. J.gen. Appl. Microbiol. 17, 77-84 (1971)
Nakase, T. und Komagata, K. : Significance of DNA base composition in the classification of yeast genus Pichia. J.gen Appl. Microbiol. 16, 511-521 (1970)
Nakase, T. und Komagata, K. : Significance of DNA base composition in the classification of yeast genus Debaryomyces. J.gen.Appl.Microbiol., 17,43-50 (1971)
Nasmyth, K. und Abraham, J. : SIR/MAR regulation of the chromatin structure of silent yeast mating type loci. (Abstract) 11.International Conference on Genetics and molecular Biology, Montpellier, France. 134 (1982)
Nasmyth, K.A. und Tatchell, K. : The structure of transposable yeast mating type loci. Cell 19, 753-764 (1980)
Naumov, G.I. und Tolstorukov, I.I. : Comparative Genetics of yeast. Communication X. Reidentification of mutators of mating-type in Saccharomyces. Soviet Genetics 9, 57-63 (1973)
Neumann, E., Gerisch, G. und Opatz, K. : Cell fusion induced by high electric impulses applied to Dictyostellium. Naturwissenschaften 67, 414-415 (1980)
Novick, R.P. : Plasmids. Scientific American 242, 77-90 (1980)

O'Conner, M.L. und Quayle, J.R. : Mutants of Hansenula polymorpha and Candida boidinii impaired in their ability to grow on methanol. J.gen.Microbiol. 113, 203-208 (1979)
O'Conner, M.L. und Quayle, J.R. : Pentose phosphate-dependent fixation of formaldehyde by methanol-grown Hansenula polymorpha and Candida boidinii. J.gen. Microbiol. 120, 219-225 (1980)
Ogata, K., Nishikawa, H., Ohsugi, M. und Tochikura, T. : Studies on the production of yeast. J.Ferment.Technol. 48 389-396 (1970)
Ogrydziak, D., Bassel, J. und Mortimer, R. : Development of the genetic map of the yeast Saccharomycopsis lipolytica. Mol.gen.Genet. 188, 179-183 (1982)
Ohnuki, T. Etoh, Y. und Beppu, T. : Intraspecific and interspecific hybridization of Mucor pusillus and M.miechei by protoplast fusion. Agric.Biol.Chem. 46, 451-458 (1982)
Oki, T., Kouno, K., Kitai, A. und Ozaki, A. : New yeasts capable of assimilating methanol. J.gen.Appl.Microbiol. 18, 295-305 (1972)
O'Malley, K., Pratt, P., Robertson, J., Lilly, M. und Douglass, M.C. : Selection of the nuclear gene for the mitochondrial adenine nucleotide transloctor by genetic complementation of the op 1 mutation in yeast. J.Biol.Chem. 257, 2097-2103 (1982)
Oshima,Y. und Takano, I. : Mating types in Saccharomyces their convertibility and homothallism. Genetics 67, 327-335 (1971)

Osiewacz, H.D. : Austausch von genetischer Information im Verlauf des parasexuellen Zyklus unter besonderer Berücksichtigung von Aspergillus niger Diplomarbeit. (RUB), Abteilung für Biology 1980
Ouchi, K., Saito, H. und Ikeda Y. : Genetic Relatedness of yeast strains Studied by the DNA-DNA Hybridization Method. Agr. Biol. Chem. 34, 95-101 (1970)

Palmer, M.L., Raker, M.A., Kennedy, P.J. Young, J.W., Barnes, W.M., Rodriguez R.L., und Noller, H.F. : Isolation and restriction mapping of plasmids contianing ribosomal DNA Sequences from the rrn B cistron of E.coli . Mol. gen. Genet. 172, 171-178 (1979)
Panthier, J.J., Fournier, P., Heslot, H. und Rambach, A. : Cloned β - Galactosidase gene of Escherichia coli is expressed in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Curr. Genet. 2, 109-113 (1980)
Papova, A. und Pugovkina, N.A. : Genetic control of the assimilation of methanol in the yeast Pichiapinus. Communication I. Production and genetic characterization of mutants not assimilating methanol. Soviet Genetics 18, 675-681 (1982)
Peberdy, J.F., Buckley, C.E., Diana, C., Daltrey und Moore, P. M. : Factors affecting protoplasts release in some filamentous fungi. Trans. Br. mycol. Soc. 67, 23-26 (1976)
Peberdy, J.F. : Fungal protoplasts : Isolation, reversion and fusion. Ann. Rev. Microbiol. 33, 21-39 (1979)
Pesti, M. und Ferenczy, L. : Protoplast fusion hybrids of Candida albicans sterol mutants differing in nystatin resistance J. gen. Microbiol. 128, 123-128 (1982)
Petersen, J.L., Olson, L.W. und Zickler, D.: Synchronous sporulation of Saccharomyces cerevisiae at high cell concentrations. Carlsberg Res. Commun. 43,241-253 (1978)
Phaff, H.J. : Yeast taxonomy proceedings of the fourth international symposium on yeasts Vienna, Austria. 49-52 (1974)
Pilwat, G., Richter, H.P. und Zimmermann, U. : Giant culture, cells by electrical field-induced fusion. FEBS Letters 133, 169-172 (1981)
Pomper, S . und Burkholder, P.R. : Studies on the biochemical genetics of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. 35, 456-464 (1949)
Poulter, R., Hanrahan, V., Jeffery, K., Makie, D., Shepherol M.G. und Sullivan, P.A. : Recombination analysis of naturally diploid Candida albicans. J.Bacteriol. 152, 969-975 (1982)
Powell, J.R. : Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow : Evidence from Drosophila.Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 492-495 (1983)
Price, C.W., Fuson, G.B., und Phaff, H.J. : Genome Comparison in yeast Systematics. : Delimitation of Species Within the genera Schwanniomyces, Saccharomyces, Debaryomyces, and Pichia, Microbiological Reviews 42, 161-193 (1978)
Provost, A. Bourguignon, C. Fournier, P. Ribet, A.M. und Heslot, H.: Intergeneric hybridization in yeast through pro last fusion FEMS Microbiol. 3, 309-312 (1978)

Quayle, J.R.: The metabolism of one-carbon compounds by micro-organisms. J.Adv.Microb. Physiol. 7,119-203 (1972)

Radford, A., Pope, S., Sazci, A., Fraser, M.J. und Parish, J.H.: Liposome-mediated genetic transformation of Neurospora crassa. Mol.gen.Genet. 184,567-569 (1981)
Rehm, H.J.: Industrielle Mikrobiologie, zweite, völlig neubearbeitete Auflage. Spriger-Verlag Berlin Heidelberg 178-187 (1980)
Reilly, J.G. und Thomas Jr.,C.A.: Length polymorphisms, restriction site variation, and maternal inheritance of mitochondrial DNA of Drosophila melanogaster. Plasmids 3, 109-115 (1980)
Reuß, M., Sahm, H. und Wagner, F.: Mikrobielle Protein-Gewinnung auf Methanol-Basis. Chem. Inge. Techn. 46, 669-710 (1974)
Richards, G.M.: Modifications of diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. Anal.Biochem. 57, 369-376 (1974)
Rine, J., Strathern, J.N., Hicks, J.B. und Herskowitz, I.: A suppressor of mating-type locus mutations in Saccharomyces cerevisiae : Evidence for and identification of cryptic mating-type loci. Genetics 93, 877-901 (1979)
Rine, J.und Herskowitz,I.: The trans action of HMRa in mating-type interconversion. Molec.gen.Genet. 180,99-105 (1980)
Roggenkamp, R.,Sahm, H. und Wagner, F.: Microbial assimilation of methanol: Induction and Function of catalase in Candida boidinii. FEBS Letters.41, 283-286 (1974)
Roggenkamp, R., Kustermann-Kuhn, B.und Hollenberg, C.P.: Expression and processing of bacterial ß-lactamase in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Proc.Natl.Acad.Sci.78, 4466-4470 (1981)
Rose, A.H. und Harrison, J.S.: The yeasts vol.I "Biology of Yeasts". Academic Press, London (1969)

Sahm, H. und Wagner, F.: Mikrobielle Verwertung von Methanol. Isolierung und Charakterisierung der Hefe Candida boidinii. Arch.Mikrobiol. 84,29-42 (1972)
Sahm, H. und Wagner, F.: Microbial assimilation of methanol. The ethanol-and methanol-oxidizing enzymes of the yeast Candida boidinii. Eur.J.Biochem.36, 250-256 (1973)
Sahm, H.: Oxidation of formaldehyde by alcohol oxidase of Candida boidinii. Arch.Microbiol. 105, 179-181 (1975)
Sahm, H.:Metabolism of methanol by yeasts. In T,K.Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough (eds.): Advances in Biochemical Engineering 6. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 76-103 (1977)
Sahm, H.: Metabolic regulation in methanol utilizers in Dechema Monographien Nr.1704-1723, Band 83 Microbiology applied to Biotechnology, Verlag-Chemie Weinheim, 95-109, (1979)
Sanders, J.P.M., Heyting, C., Verbeet, M.Ph., Meijlink, F.C.P.W. und Borst,P.: The organization of genes in yeast mt DNA. III. Comparison of the physical maps of the mitochondrial DNAs from three wild-type Saccharomyces strains. Mol.gen. Genet. 157, 239-261 (1977)

Sarachek, A. und Rhoads, D.D. : Production of heterokaryons of Candida albicans by protoplast fusion : Effect of differences in proportions and regenerative abilities of fusion partners. Curr.Genet. 4, 221-222 (1981)
Scheda, R. und Yarrow, D. : The instability of phisiological properties used as criteria in the taxonomy of yeasts. Archiv für Mikrobiol. 55, 209-225 (1966)
Scheurich, P. und Zimmermann, U. : Giant human erythrocytes by electric-field-induced cell-to-cell fusion. Naturwissenschaften 68, 45-47 (1981 a)
Scheurich, P. und Zimmermann, U. : Electrical stimulated fusion of different plant cell protoplast. Plant Physiol. 67 849-853 (1981 b)
Schild, D., Konforti, B., Perez, C. Gish, W. und Mortimer, R. : Isolation and characterization of yeast DNA repair genes I. Cloning of the RAD 52 gene. Curr.Genet. 7 85-92 (1983)
Schildkraut, C.L., Marmur, J. und Doty, P. : Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its bouyant density in CsCl. J. Mol.Biol. 4, 430-443 (1962)
Schütte, H., Flossdorf, J., Sahm, H. und Kula, M.R. : Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from Candida boidinii. Eur.J. Biochem. 62, 151-160 (1976)
Sena, E.P. : Effect of the kar gene on cytoplasmic mixing and mitochondrial genome suppressiveness, and consequences for cytoduction of petite DNA in Saccharomyces cerevisiae. Curr.Genet. 5, 47-52 (1982)
Sherman, F. und Lawrence, C.W. : Saccharomyces : In Handbook of Genetics Vol.I. R.C. King (ed.). Plenum Press New York, London. 359-393 (1974)
Shapiro, J.A. : Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage MU and other transposable elements. Proc.Natl.Acad.Sci. 76, 1933-1937 (1979)
Sipiczki, M. und Ferenczy, L. : Fusion of Rhodosporidium (Rhodotorula)protoplasts. FEMS 2, 203-205 (1977)
Sipiczki, M. : Interspecific protoplast fusion in yeasts. Curr.Microbiol. 3, 37-40 (1979)
Sipiczki, M. und Ferenczy, L. : Protoplast fusion of Schizosaccharomyces pombe auxotrophic mutants of identical mating-type. Mol.gen.Genet. 151, 77-81 (1977)
Sprague, Jr. G.F., Jensen, R. und Herskowitz, I. : Control of yeast cell type by the mating type locus,positive regulation of the α-specific STE3 gene by the MATα1 product. Cell 32, 409-415 (1983)
Sprague, Jr.G.F., Rine, J. und Herskowitz,I. : Homology and non-homology at the yeast mating-type locus. Nature 289, (1981)
Spencer, J.F.T. und Spencer, D.M. : The use of mitochondrial mutants in hybridization of industrial yeasts. Curr.Genet. 4, 177-180 (1981)
Sriprakash, K.S. und Batum, C. : Segregation and transmission of mitochondrial markers in fusion products of the Asporogenous yeast Torulopsis glabrata. Curr.Genet. 4, 73.-80 (1981)
Stahl, U. : Zygote formation and recombination between like mating types in the yeast Saccharomycopsis lipolytica by protoplast fusion. Mol.gen.Genet. 160, 111-113 (1978)

Stahl, U. und Esser, K.: Subsequent transfers of yeast may lead via single gene mutations to alterations of the species. Biotechnol.1, 383-385 (1979 a)
Stahl, U. und Esser, K. : Inconsistency in the species concept for yeasts due to mutations during vegetative growth. European J.Appl. Microbiol. biotechnol.8, 271-278 (1979 b)
Stenderup, A. und Leth Bak, A.: Deoxyribonucleic Acid Base Composition of Some species within the genus Candida. J. gen. Microbiol. 52, 231-236 (1968)
Stewart, P.R.: Analytical methods for yeasts. In methods in Cell Biology XII edited by D.M. Presscott, Academic Press, New York, 111-125 (1975)
Stock,D.A. und Black, S.H.: Meiosis in Hansenula wingei and H.holstii. J. gen. Microbiol.64, 365-372 (1970)
Storck, R.: Nucleotide composition of nucleic acids of fungi, II Deoxyribonucleic Acids. J.Bact. 91,227-230 (1966)
Storck, R., Alexopoulos, C.J. und Phaff, H.J.: Nucleotide composition of deoxyribonucleic acid of some species of Cryptococcus, Rhodotorula and Sporobolomyces. J.Bact. 98, 1069-1072 (1969)
Strathern, J.N. und Herskowitz, I.: Asymmetry and Direc-tionality in Production of New Cell Types during Clonal Growth: the Switching Pattern of Homothallic Yeast. Cell 17, 371-381 (1979)
Strathern, J.N., Newlon, C.S., Herskowitz, I. und Hicks, J.B.: Isolation of a circular derivative of yeast chromosome III: Implications for the mechanism of mating-type interconversion. Cell 18, 309-319 (1979)
Strathern, J.N., Hicks, J. und Herskowitz, I.: Control of cell type in yeast by the mating type Locus. The α1 - α2 Hypothesis. J.Mol.Biol. 147, 357-372 (1981)
Struhl, K.,Stinchcomb, D.T., Scherer, S. und Davis, R. W.: High-frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. Proc.Natl.Acad. Sci. 76, 1035-1039 (1979)
Sukroongreung, S., Miranda, L.R. de.: A new aspect of the life cycle of Candida tropicalis. Ant. van Leeuwenhoek 39, 65-80 (1973)
Surewicz, W.K.: Electron spin resonance study on mechanism of polyethylene glycol - membrane interaction. FEBS Letters 151, 228-231 (1983)
Svoboda, A. : Mating reaction in yeast protoplasts. Arch.Microbiol. 110, 313-318 (1976)
Szybalski, W.: Use of cesium sulphate for equilibrium density gradient centrifugation. In Methods in Enzymology XII. Nucleic Acids part B: L. Grossman and K. Moldave (eds.), Academic Press, New York, London, 330-360 (1968)

Takano, I. und Oshima, Y.: Anallel specific and a Complementary Determinant controlling Homothallism in Saccharomyces oviformis. Genetics 57, 875-885 (1967)
Takano, I und Oshima, Y.: Mutational Nature of an Allelespecific Conversion of the Mating Type by the homothallic Gene. Genetics 65, 421-427 (1970)
Takano, I., Kusumi, T. und Oshima, Y. : An α Mating Type Allele insensitive to the mutagenic Action of the Homothallic Gene system in Saccharomyces diastaticus. Mol. Gen. Genet. 126, 19-28 (1973)
Tamaki, H.: Genetic Properties of abortive products resulting from the protoplast fusion in yeasts Mol. Gen. Genet. 187, 177-179 (1982)
Tanaka, T., Kita, H., Murakami, T. und Narita, K.: Purification and amino acid sequence of mating factor from Saccharomyces cerevisiae. J. Biochem. 82, 1681-1687 (1977)
Tanaka, T. und Kita, H.: Degradation of mating factor by α-mating type cells of Saccharomyces cerevisiae. J.Biochem. 82, 1689-1693 (1977)
Tani, Y., Miya, T., Nishikawa, H. und Ogata, K.: The microbial metabolism of methanol. Part I. Formation and crystallization of methanol-oxidizing enzyme in a methanol-utilizing yeast, Kloeckera sp. No. 2201 Agr. Biol. Chem. 36, 68-75 (1972a)
Tani, Y., Miya, T. und Ogata, K.: The microbial metabolism of methanol. Part II. Properties of crystalline alcohol oxidase from Kloeckera sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem. 36, 76-83 (1972b)
Tani, Y., Kato, N. und Yamada, H.: Utilization of methanol by yeasts. Adv. Appl. Microbiol. 24, 165-186 (1978)
Tolstorukov, I.I., Dutova, T.A., Benevolensky, S.V. und Soom, ya. O.: Hybridization and genetic analysis of the methanol yeasts Pichia pinus. Soviet Genetics. 13,230-235 (1977)
Tolstorukov, I.I. und Benevolensky, S.V.: Study of the mechanisms of mating and self-diploidization in haploid yeasts Pichia pinus, Communication I. Bipolarity of mating. Soviet Genetics 14, 359-366 (1978)
Tsuboi, M.: Sporulation of spheroplasts in Saccharomyces cerevisiae. Plant&Cell Physiol. 22, 65-71 (1981)
Tsuboi, M.: Sporulation of products of protoplast fusion without regeneration in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 182, 1-6 (1981)
Tudzynski, P. und Vorlberger, U. : V. Extrakaryotic Inheritance (a) General aspects. In Progress in Botany, Fortschritte der Botanik Vol. 42: Ellenberg, H., Esser, K., Kubitzki, K., Schnepf, E. und Ziegler, H. (eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 212-226 (1980)
Tudzynski, P., Düvell, A. und Esser, K. : Extrachromosomal genetics of Claviceps purpurea I. Mitochondria DNA and mitochondria plasmids. Curr. Genet. 7, 145-150 (1983)

Upholt, W.B. und Dawid, I.B.: Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats : Rapid evolution in the D-loop region. Cell 11, 571-583 (1977)

Vallin, C. und Ferenczy, L.: Diploid formation of Candida tropicalis via protoplast fusion. Acta.microbiol. Acad. Sci. hung. 25, 209-212 (1978)
Vallin, C., Kucsera, J., Klinner, U. und Ferenczy, L.: Intergeneric protoplast fusion between Candida tropicalis and Pichia guilliermondii. (Abstract). 5. International Protoplast Symposium, P.59 Szeged (Ungarn) 1979

Van der Walt, J.P. und Johannsen, E.: A comparison of Interfertility and in vitro DNA-DNA Reassociation as criteria for speciation in the genus Kluyveromyces. Ant. van Leeuw. 45 281-291 (1979)
Van der Walt, J.P. und Yarrow, D.: Pichia kodamae sp. nov., A new homothallic yeast species. J. Gen. Appl. Microbiol. 28, 155-160 (1982)
Van, Rij , K. N.J.W. : Toxonomy and systematic of yeasts, In The yeasts edited by A. H. Rose und J.S. Harrison, Vol. I, Academic Press, London, 5-78 (1969)
Van Solingen, P. und van der Plaat, J.B. : Fusion of yeast spheroplasts. J. Bacteriol. 130, 946-947 (1977)
Vidoli, R., Yamazaki, H., Nasim, A. und Veliky, I.A. : A novel procedure for the recovery of hybrid products from protoplast fusion. Biotechnology Letters 4, 781-784 (1982 a)
Van Dijken, J.P., Castra-Demkes, G.J., Otto, R. und Harder, W.: S- formylglutathione: The substrate for formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeasts.
Van Dijken, J.P., Harder, W., Beardsmore, A.J. und Quayle, J.R. : Dihydroxyacetone : An intermedeate in the assimilation of methanol by yeasts. FEMS Microbiol. Letters 4, 97-102 (1978)
Van Dijken, J.P. , Otto, R. und Harder, W.: Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by catalase purified from methanol-grown Hansenula polymorpha. Arch. Microbiol. 106, 221-226 (1975)

Wagner, F.: Methanol: a fermentation substrate. Experientia 33, 110-113 (1977)
Waites,M.J. und Quayle, J.R. : Dihydroxyaceton: A product of Xyrulose 5 Phosphate- dependent fixation of formaldehyde by methanol-grown Candida boidinii. J.gen.Microbiol. 118, 321-327 (1980)
Waites, M.J. und Quayle, J.R.: The interrelation between transketolase und dihydroxyaceton synthase activities in the methylotrophic yeast Candida boidinii. J.gen.Mikrobiol. 124, 309-316 (1981)
Waites, M.J. und Quayle, J.R.: Dihydroxyacetone synthase: a special transketolase for formaldehyde fixation from the methylotrophic yeast Candida boidinii CBS 5777. J.gen. Microbiol. 129, 935-944 (1983)
Weber, H., Förster, W., Berg, H. und Jacob, H.E.: Parasexual hybridization of yeasts by electric field stimulated fusion of protoplasts. Curr. Gent. 4, 165-166 (1981)
Wesolowski, M., Algeri, A.und Fukuhara, H.: Gene Organization of the mitochondrial DNA of yeasts: Kluyveromyces lactis and Saccharomycopsis lipolytica. Curr. Genet. 3, 157-162 (1981)
Whittaker, P.A. und Leach S.M.: Interspecific hybrid production between the yeasts. Kluyveromyces lactis and Kluyveromyces fragilis by protoplast fusion FEMS Microbiol. 4, 31-34 (1978)
Wickerham, L.J. : A cadaver yeast and related species. Mycologia 56, 398-414 (1964)

Wickerham, L.J., Kurtzman, C.P. und Herman, A.: Sexual Reproduction in Candida lipolytica. Science 167, 1141 (1970)
Wilkinson, L.E. und Pringle, J.R.: Transient G1 arrest of S. cerevisiae cells of mating type α by A factor produced by cells of mating type a. Experimental Cell Research 89, 175-187 (1974)
Williamson, V.M., Bennetzen, J., Young, E.T., Nasmyth, K. und Hall, B.D.: Isolation of the structural gene for alcohol dehydrogenase by genetic complementation in yeasts. Nature 283, 214-218 (1980)
Wilson, J.J. Khachatorians, G.G. und Ingledew, W.M.: Protoplast fusion in the yeasts, Schwanniomyces alluvius. Mol. Gen. Genet. 186, 95-100 (1982)
Winge, O., und Robert, C.: Life history and cytology of yeast. In the Chemistry and Biology of yeasts. Edited by A.H. Cook, Academic Press New York, 93-122 (1958)
Wolf, K. : Divergence of mitochondrial genoms in yeast. Abstract von Jarestagung der Gesellschaft für Genetik. in Hamburg (29.9.-1.10) (1982)
Wolf,K. Guidice,D. und Kaudewitz, F.: Promotion of uniparental inheritance of mitochondrial drug resistance by delayed division of yeast zygotes. Mol.gen.Genet. 176, 301-302 (1979)

Yamamoto, M. und Fukui, S. : Fusion of yeast protoplasts. Agr.Biol.Chem. 41, 1829-1830 (1977)
Yamashita,K., Fukuda, H., Murata, K. und Kimura, A. : Transfer of mitochondria of Hansenula wingei into protoplasts of Saccharomyces cerevisiae by mini-protoplasts fusion. FEBS Letters 132, 305-307 (1982)
Yamazaki, T. und Oshima, Y. : Heterogeneity of ploidy in Saccharomycodes ludwigii. J.Ferment.Technol. 57, 260-264 (1979 a)
Yamazaki, T. und Oshima, Y.: Direct diploidization and occurrence of polyploidy in Saccharomycodes ludwigii. J.gen. Microbiol.111, 271-281 (1979 b)
Yarrow, D. und Nakase, T. : DNA base composition of species of the genus Saccharomyces. Antonie van Leeuwenhoek 41, 81-88 (1975)
Yokote, Y. Sugimoto, M. und Abe, S. : Yeast utilizing methanol as a sole carbon source. J.Ferment.Technol. 52, 201-209 (1974)
Yoshida, K.: Interspesific und intraspesific mitochondrial induced cytoplasmic transformation in yeasts. Plant and Cell Physiol. 20, 851-856 (1979)
Yoshida, K. und Takeuchi, I.K. : Cytological studies on mitochondria- induced cytoplasmic transformation in yeasts. Plant and Cell Physiol. 21, 497-509 (1980)

Zamir, A., Maina, C.V., Fink, G.R. und Szalay, A.A.: Stable chromosomal integration of the entire nitrogen fixation gene cluster from Klebsiella pneumoniae in yeast. Proc.Natl. Acad.Sci. 78, 3496-3500 (1981)
Zimmermann, U. und Scheurich, P. : High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. Planta 151, 26-32 (1981)
Zimmermann, U. und Scheurich, P. : Fusion of Avena sativa mesophyll cell protoplasts by electrical breakdown. Biochim.Biophys.Acta. 641, 160-165 (1981 b)
Zimmermann, U. und Vienken, J. : Electric field-induced Cell-to-cell fusion. J.Membrane Biol.67, 165-182 (1982)

Lebenslauf:

12.09.1952	: geboren in Bangkok/Thailand als Tochter der Eheleute Hudsui und Pensri Plangpatanapanichya
1958-1962	: Besuch der Grundschule "Lerdprasatvischa" in Bangkok
1962-1970	: Besuch der Hauptschule "Utsahasögsa" und "Kunateerutaram" in Bangkok
1970	: Reifeprüfung
1970-1974	: Biologiestudium (Botanik) an der "Chulalongkorn" Universität in Bangkok
1974	: Bacherlor-Degree of Science (B.Sc.honour)
1974-1976	: Botanik-Studium an der "Chulalongkorn" Universität (Graduate-School)
1976	: Master-Degree of Science (M.Sc.)
seit 1.9.1976	: Wissenschaftliche Assistentin am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Abteilung für Medizin der "Mahidol" Universität
seit 1.10.1978	: Erhalt eines DAAD-Stipendiums
4.07.1980	: Eheschließung mit Vithoon Chaiprasert
1981	: Geburt unserer Tochter, Visatschana Chaiprasert
seit 1.01.1979	: Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Herrn Professor Dr.Dr.h.c. K.Esser.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353